

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PÄTENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

CB

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
14. März 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/21138 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/68

Daniela [DE/DE]; Rathenaussasse 4, 68165 Mannheim  
(DE). SCHEEK, Sigrid [DE/DE]; Jahnstrasse 36, 69221  
Dossenheim (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/10366

(22) Internationales Anmeldedatum:  
7. September 2001 (07.09.2001)

(74) Anwalt: ISENBRUCK, Günter; Bardchle-Pagenberg-  
Dost-Altenburg-Geissler-Isenbruck, Theodor-Heuss-An-  
lage 12, 68165 Mannheim (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
09/657,479 7. September 2000 (07.09.2000) US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): AXARON BIOSCIENCE AG [DE/DE]; Im Neuen-  
heimer Feld 515, 69120 Heidelberg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,  
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHNEIDER, Armin  
[DE/DE]; Am Büchsenackerhang 69, 69118 Heidel-  
berg (DE). HIEMISCH, Holger [DE/DE]; Peterstaler  
Strasse 115, 69118 Heidelberg (DE). ROSSNER, Moritz  
[DE/DE]; Zähringerstrasse 41, 68723 Schwetzingen (DE).  
KLUGMANN, Matthias [DE/DE]; Mittermaierstrasse  
12, 69115 Heidelberg (DE). NAIM, Jomana [DE/DE];  
Im Buschgewann 29, 69123 Heidelberg (DE). EISEN-  
HARDT, Gisela [DE/DE]; Emmertsgrundpassage 23,  
69126 Heidelberg (DE). KUNER, Rohini [DE/DE];  
Turnerstrasse 50, 69126 Heidelberg (DE). LANAHAN,  
Anthony [US/US]; 15 Dendron Court, Parkville, MD  
21234 (US). WORLEY, Paul [US/US]; 17 Blythewood  
Road, Baltimore, MD 21210 (US). SPIELVOGEL,

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: THE M30 GENE FAMILY AND THE UTILIZATION THEREOF

(54) Bezeichnung: DIE M30-GENFAMILIE UND IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to, among other things, a method for diagnosing neurodegenerative diseases. According to the invention, the concentration of a protein, which shares similarities with the protein Pellino, or of a mammal homologue of this protein or of a mutein of this protein, which, over a domain of 50 amino acids of the amino sequence thereof, shares a sequence identity of over 60 % with one of the sequences, is determined in a body sample. The invention also relates to the utilization of ligands, which bind to M30 and to the homologues thereof, and to the utilization of functional inhibitors for producing a medicament for treating neurodegenerative diseases. The invention additionally relates to a screening method for identifying and/or characterizing functional inhibitors and/or ligands of M30 or of a homologue of M30.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft unter anderem ein Verfahren zur Diagnose neurodegenerativer Erkrankungen, bei dem die Konzentration eines Proteins, das Ähnlichkeiten mit dem Protein Pellino besitzt, oder eines Säugetier-Homologes dieses Proteins oder eines Muteins dieses Proteins, das über einen Bereich von 50 Aminosäuren seiner Aminosäuresequenz eine Sequenzidentität mit einer der Sequenzen von über 60 % aufweist, in einer Körperprobe bestimmt wird. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Liganden, die an M30 und seine Homologen binden, sowie die Verwendung von funktionalen Inhibitoren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen. Desweiteren betrifft die Erfindung ein Screening-Verfahren zur Identifikation und/oder zur Charakterisierung von funktionalen Inhibitoren und/oder von Liganden von M30 oder einem Homologen von M30.



WO 02/21138 A2

---

## Die M30-Genfamilie und ihre Verwendung

---

5

- Die vorliegende Erfindung betrifft die M30-Genfamilie und die Verwendung der Gene und Genprodukte. Der Schlaganfall wird heute zunächst durch die eingehende neurologische Untersuchung festgestellt. Häufige Symptome sind: Lähmung, Sprachstörung, Sehstörung.
- 10 Danach erfolgt eine radiologische Untersuchung mit Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MR). Die letztere Untersuchung setzt sich trotz höherer Kosten durch, da sie eine höhere Auflösung und die Bestimmung zusätzlicher Parameter erlaubt. Besonders für die Schlaganfalldiagnostik interessant sind dabei die Diffusions- und Perfusions-gewichteten Aufnahmen. Diese Techniken erlauben es, neben der akuten
- 15 Ausdehnung des Schlaganfalls auch das Gebiet zu bestimmen, das unter einer relativen Mangel durchblutung leidet und wahrscheinlich in der weiteren Ausdehnung des Schlaganfalls liegen wird („*area at risk*“). Ebenso erlauben die MR-Techniken eine sehr frühe Diagnose des Infarktgebietes, das im CT erst später sicher beurteilbar wird.
- 20 Darüber hinaus wurde festgestellt, daß bestimmte Proteinmarker wie die astrozytären Proteine S100 und GFAP bei Schlaganfall im Liquor cerebrospinalis vermehrt auftreten. Auch die Konzentration des Neurofilaments NFL scheint bei einer Anzahl neurodegenerativer Erkrankungen im Liquor erhöht zu sein. Es sind überdies auch negative Marker bekannt. So korreliert die intrathekale Konzentration einer Anzahl von Peptiden (z.
- 25 B. Fas, Il6, Il1beta) negativ mit der Infarktausdehnung. In jüngster Zeit haben es Fortschritte in den Mikrodialysesonden erlaubt, dieses Hilfsmittel für die Verlaufsbeurteilung von Patient mit Hirnschädigung auf der Intensivstation einzusetzen. Die bisher bekannten Proteinmarker weisen jedoch den Nachteil auf, daß ihre Konzentration nur bei einem sehr begrenzten Bereich mit der Schwere der Krankheit
- 30 korreliert, so daß eine Vielzahl von Markern verfolgt werden muß, um zu einer abgesicherten Diagnose des Krankheitsverlaufs zu kommen.

BESTÄTIGUNGSKOPIE

Es ist folglich Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Proteinmarker für den Liquor cerebrospinalis anzugeben, welcher das Ausmaß neuronaler Schädigung umfassend anzeigt und sich als diagnostischer Marker für den Schlaganfall eignet. Weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, einen diagnostischen Marker für Krebs, insbesondere

5 Ovarialkrebs, anzubieten.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung liegt darin, Strategien für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen aufzuzeigen.

Die Aufgabe wird zum einen gelöst durch ein Verfahren zur Diagnose neurodegenerativer

10 Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration eines Proteins, aufweisend eine der Sequenzen SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, oder eines Säugetier-Homologen dieses Proteins oder ein natürlichen Säugetiermureins dieses Proteins, das über einen Bereich von 50 Aminosäuren seiner Aminosäuresequenz eine Sequenzidentität mit einer der Sequenzen von über 60 % aufweist, in einer Körperprobe bestimmt wird.

15 Die Sequenzen ergeben sich gemäß Tabelle 1 aus dem Sequenzprotokoll.

20

25

30

Tabelle 1

Seq ID No	Protein	Variante	TYP	Organism.
1	M30		cDNA	Rattus
2	M30		Protein	Rattus
3	M30	A	cDNA	Homo
4	M30	A	Protein	Homo
5	M30	B	cDNA	Homo
6	M30	B	Protein	Homo
7	M30	C	cDNA	Homo
8	M30	C	Protein	Homo
9	M30	D	cDNA	Homo
10	M30	D	Protein	Homo
11	M31		cDNA	Mus musc.
12	M31		Protein	Mus musc.
13	M31		cDNA	Homo
14	M31		Protein	Homo
15	M33		cDNA	Homo
16	M33		Protein	Homo
17	M32	Fragm.	cDNA	Homo
18	M32	Fragm.	Protein	Homo

(erste Spalte: Nummer gemäß Sequenzprotokoll, zweite Spalte: Bezeichnung des Proteins, dritte Spalte: Variante des Proteins, vierte Spalte: Typ der Sequenz, fünfte Spalte: Organismus, aus welchem die Sequenz stammt).

Der Begriff des Säugetier-Homologen besagt im vorgenannten Kontext, daß das Protein natürlich (das heißt nicht-rekombinant) in einem Säugetierorganismus vorhanden ist und mit einer der Sequenzen SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 über einen Bereich von 60 Aminosäuren eine Sequenzidentität von über 60 % aufweist. Bevorzugt weist das Homologe eine Sequenzidentität von 60%, 70%, 80% oder 90% über einen Bereich von 60, 80, 100, 189, 300, 400 Aminosäuren beziehungsweise über seine ganze Länge auf.



Der Begriff des natürlichen Säugetiermuteins besagt im vorgenannten Kontext, daß das Protein natürlich in einem Säugetierorganismus vorhanden ist und eine Abwandlung eines Wildtypproteins darstellt (Mutein = mutiertes Protein) und mit einer der Sequenzen SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 über einen Bereich von 60 Aminosäuren eine Sequenzidentität von über 60 % aufweist. Bevorzugt weist das natürliche Säugetiermutein eine Sequenzidentität von 60%, 70%, 80% oder 90% über einen Bereich von 60, 80, 100, 189, 300, 400 Aminosäuren beziehungsweise über seine ganze Länge auf.

Der Begriff der Sequenzidentität bezieht sich auf die Aminosäuresequenz und basiert auf dem Algorithmus von Altschul et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990, insbesondere auf dem Programm Megalign (DNASTar, Lasergene, Madison, Wisc. U.S.A.), wobei folgende Parameter zu verwenden sind:

gap penalty 10,

gap length penalty 10

Pairwise Alignment

K-tuple 1

gap penalty 3

window 5

diagonals saved 5

Bei der Berechnung der Sequenzidentität gehen nur Sequenzabschnitte der angegebenen Größe ein.

Proteine, aufweisend eine der Sequenzen SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, oder ein Säugetier-Homologes dieses Proteins oder ein natürliches Säugetiermutein dieses Proteins, das über einen Bereich von 50 Aminosäuren seiner Aminosäuresequenz eine Sequenzidentität mit einer der Sequenzen von über 60 % aufweist, werden im folgenden Mitglieder der M30-Genfamilie genannt.

Der Begriff des Gens ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgängig im weitesten Sinn zu verstehen. Erstens ist ein Gen der Abschnitt auf dem Genom, der für ein Protein, das primäre Genprodukt, codiert und der Informationen für die Gewebespezifität, Zellcyclusabhängigkeit und Umfang der Transkription des Genprodukts aufweist. Zur

Regulation der Transkription des primären Genproduktes sind abgesehen von den zu dem Gen gehörenden Regulationssequenzen weitere Proteine notwendig, deren Sequenz zum Teil ebenfalls von dem Gen codiert und deren Transkription ebenfalls von Regulationssequenzen des Genes gesteuert werden kann (aber nicht muß). Dies bedeutet, daß der Begriff des Gens den die Transkription der Sequenz des primären Genprodukts steuernden Promotor und gegebenenfalls weitere Regulationssequenzen (wie Enhancer) mitumfaßt. Zweitens umfaßt der Begriff des Gens alle Nukleinsäuren, die durch Spleißen des Gen entstehen sowie ihre mittels reverser Transkriptase erstellten cDNA-Transkripte. Drittens umfaßt der Begriff des Gens die vollständig gespleißte, gegebenenfalls polyadenylierte mRNA und daraus hervorgehende cDNA. Das Gen weist also codierende und nicht-codierende Sequenzabschnitte auf, die je nach dem, ob sie vor oder hinter dem offenen Leseraster des primären Genproduktes in 5'->3' Orientierung liegen, 5'-nichttranslatierte oder 3'-nichttranslatierte Bereiche heißen. Das offene Leseraster des primären Genproduktes eines Gens wird auch als Strukturgen bezeichnet.

Die RNA-Produkte des Gens M30 werden nach Induktion eines maximalen Elektroschocks (MECS) im Gehirn von Ratten verstärkt exprimiert und konnten durch ein modifiziertes differentielles Klonierungssystem (Suppression Subtractive Hybridization SSH) kloniert werden. Dabei wird ein Elektroschock, der zu einem Krampfanfall führt, insgesamt fünfmal wiederholt; gleichzeitig wird ein Translationsblocker (Cycloheximid) gegeben, der den Regulationseffekt verstärkt. Dieses experimentelle System erlaubt die effiziente Identifikation von sogenannten „immediate early genes“, die häufig kritische Regulationselemente in Signaltransduktionswegen darstellen (wie Lernvorgänge, Gedächtnis, synaptische Transmission, Yamagata et al., Neuron, 11, 371-86, 1993; Xiao, et al., Neuron, 21, 707-16, 1998; Brakeman, et al., Nature, 386, 284-8, 1997; WO 99/40225).

Die Expression von M30 wird ebenfalls durch Stimuli induziert, die mit neuronaler Schädigung assoziiert sind. Eine Induktion der M30-Transkriptmenge im Hippocampus der Ratte wurde ebenfalls nach Gabe von Kainat beobachtet, einem Stoff der zur Übererregung glutamaterger Synapsen führt, und Zelltod auslösen kann.

Ebenso wird die M30-Transkriptmenge nach fokaler Ischämie der Maus erhöht, die bei Mäusen ausgelöst wird, um einen Schlaganfall zu simulieren.

- 5    Zumindest im Falle des Menschen ist es nicht korrekt von dem M30-Protein bzw. dem M30-Transkript zu sprechen, vielmehr existieren vier verschiedene Transkripte, die jeweils unterschiedliche Exone umfassen (Variante A und B bzw. Variante C und D codieren jeweils für dasselbe Protein). Daneben gehören noch weitere Proteine M31, M32 und M33 zur selben Proteinfamilie wie sich aus der Zusammenstellung der Sequenzen ergibt.

10

- Es ist anzunehmen, daß die erfindungsgemäßen weiteren Homologen der M30-Genfamilie ein sehr ähnliches Expressionsmuster wie M30 zeigen und daß sie nach MECS-Stimulation, Kainatinjektion oder nach Hervorrufen einer fokalen Ischämie gleichermaßen  
15    hochreguliert werden. M31 unterscheidet sich von den anderen Vertretern derselben Genfamilie dadurch, daß es darüber hinaus eine sehr hohe Expression in Ovarialtumoren zeigt.

- Bei der im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zu untersuchenden Körperprobe  
20    handelt es sich bevorzugt um den Liquor cerebrospinalis, der eine relativ wenig invasive Messung der Proteinkonzentration ermöglicht. Ferner kann es sich bei der die Körperprobe auch um Blut handeln. Zwar verhindert in der Regel die Blut-Hirn-Schranke den Übertritt der Proteine in die Blutbahn. Neurodegenerative Erkrankungen gehen aber zum Teil mit einer partiellen Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke einher.

- 25    Abgesehen von der bevorzugten humoralen Analyse können auch Hirn-Biopsien Gegenstand der Untersuchungen sein. In diesem Fall wird das Präparat in der Regel histologisch untersucht werden, so daß weniger die Proteinkonzentration sondern vielmehr der Status der Überexpression durch immunocytochemisches Anfärben des Proteins oder seines Transkriptes im Vergleich mit Proben gesunder Menschen bestimmt wird. Der  
30    Begriff der Bestimmung der Proteinkonzentration ist im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens entsprechend weit zu verstehen.

Es ist klar, daß sich im Liquor cerebrospinalis nur die Mitglieder der M30-Genfamilie nachweisen lassen, die auch vor Eintritt des neurodegenerativen Prozesses im ZNS des jeweiligen Patienten vorhanden waren. Handelt es sich bei dem Patienten um einen Menschen, so können nur die Konzentration von menschlichen Homologen oder gegebenenfalls pathologische oder nicht-pathologische Muteine dieser menschlichen Homologen Gegenstand der Untersuchungen sein. Die Messung der Konzentration der Mitglieder der M30-Genfamilie im Liquor cerebrospinalis erfolgt durch übliche Methoden, z.B. durch Einsatz polyklonaler, monoklonaler oder rekombinanter Antikörper z.B. im Rahmen eines ELISA-Experiments (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) eines FIA-Experiments (Flow Induction Analysis) oder eines anderen Biosensors (Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications. Ursula E. Spichiger-Keller (1998) Wiley/VCH, Weinh.; ISBN:3527288554; Biosensoren (Biotechnologie) Elizabeth A.H. Hall (1994) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg; ISBN: 3540574786) oder durch im Rahmen quantitativer analytischer Affinitätschromatographie bzw. quantitativer Affinitätskapillarelektrophorese.

Ein anderer Ansatz besteht darin, die Fähigkeit der Mitglieder der M30-Genfamilie mit anderen Wechselwirkungspartnern supramolekulare Komplexe zu bilden, zur Konzentrationsbestimmung auszunützen. So ist M30 in der Lage mit M32 ein Heterodimer zu bilden. Diese Eigenschaft könnte im Rahmen einer quantitativen analytischen Affinitätschromatographie ausgenutzt werden, indem man den einen Wechselwirkungspartner oder die für die Interaktion mit dem anderen Partner wichtigen Sequenzabschnitt auf einer Säule immobilisiert. Auf eine ähnliche Weise könnte auch eine quantitative Affinitätskapillarelektrophorese durchgeführt werden, bei man einen Wechselwirkungspartner oder die für die Interaktion mit dem anderen Partner wichtigen Sequenzabschnitt mit der Kapillarmatrix kovalent verbindet.

Im übrigen kann die Messung der Konzentration des betreffenden Proteins auch indirekt über die Messung der Konzentration des für das Protein codierende Transkript erfolgen, da Protein- und Transkriptkonzentration in der Regel korreliert sind. Probleme können sich allenfalls aufgrund der begrenzten Stabilität der Transkripte im Liquor cerebrospinalis

ergeben. Diese fallen aber je nach Art der neurodegenerativen Erkrankung mehr oder weniger ins Gewicht; zumindest für akut verlaufende neurodegenerative Erkrankungen wie Schlaganfall ist diese Methode anwendbar. Die Bestimmung der Transkriptkonzentration erfolgt am einfachsten mit quantitativer PCR (Polymerase Chain Reaction). Folglich  
5 umfaßt die Ausdruck Bestimmung die Konzentration eines Proteins im Liquor cerebrospinalis auch die Bestimmung der Konzentration des für das Protein codierenden Transkripts.

Die Diagnose erfolgt im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens durch Vergleich der  
10 Konzentration des zu untersuchenden Proteins in der Körperprobe mit dem Wert aus Proben gesunder Menschen ohne Befund. Je höher der ermittelte Wert, desto höher das Ausmaß der neurodegenerativen Zellschädigung. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht folglich eine Verlaufskontrolle, also die Verfolgung des Ausmaßes neurodegenerativer Schädigung in Echtzeit oder mit nur geringer zeitlicher Verzögerung.

15 Damit eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere, um die Therapie von intensivmedizinisch betreuten Patienten dem Krankheitsverlauf anzupassen. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich auch zur Überprüfung der Wirkung von Pharmaka zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen entweder direkt am behandelten Patienten oder im Tiermodell. Dementsprechend bezieht sich das  
20 erfindungsgemäße Verfahren sowohl auf Körperproben aus Tieren als auch auf Körperproben auf Menschen. In der Regel wird es sich bei den Tieren um Säugetiere handeln, speziell um Säugetiere die sich als Versuchstier etabliert haben (Ratten, Mäuse, Kaninchen, Hunde usw.).

25 Der Begriff neurodegenerative Erkrankung ist im weitesten Sinne zu verstehen. Er umfaßt auch neuroinflammatorische Erkrankungen, wenn sie, wenn auch nur temporär, mit einem Untergang von Neuronen verbunden sind.

Neurodegenerative Erkrankungen sind folglich chronische Krankheiten wie Fragiles X-Syndrom, Morbus Huntigton und anderen Krankheiten aus dem Formenkreis der  
30 Tripletexpansionskrankheiten (trinucleotide repeat expansion abnormalities; Kirkwood SC et al., Arch Neurol 2000 Jul; 57(7):1040-4; Ohara1 K, et al., Psychiatry Res 2000 Jul 17; 94(3):257-62), ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis), olivo-ponto-cerebelläre Degeneration

Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Multiple Sklerose. Bei diesen Krankheiten kann mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens das Fortschreiten der Neurodegeneration beobachtet werden, was eine entsprechende Adaption der Therapie ermöglicht. Dies ist um so einfacher möglich, da bei diesen Krankheiten ohnehin häufig Liquorproben entnommen werden.

Neurodegenerative Erkrankungen sind ferner akut verlaufende Krankheiten wie Schlaganfall oder auch Schädel-Hirn Traumata sowie entzündliche Erkrankungen des Hirns wie Meningitis oder auch Epilepsie. Diesen Krankheiten ist gemeinsam, daß sie mit dem Untergang von Neuronen einhergehen. Dieser Untergang läßt sich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren sicher diagnostizieren und zeitlich verfolgen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein, aufweisend eine Sequenz SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10 12, 14, 16, 18 oder ein Homologes oder Mutein desselben, das über einen Bereich von 189 Aminosäuren eine Sequenzidentität mit einer der Sequenzen SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10 12, 14, 16, 18 von größer 55 %, vorzugsweise mit SEQ ID NO 16 von größer 81 % oder mit SEQ ID NO 14 von größer 69 % aufweist oder ein Fusionsprotein eines solchen Proteins mit einem anderen Protein darstellt.

Bei dem Homologen handelt es sich um ein natürliches (das heißt nicht-rekombinantes) Protein, welches in einem Organismus vorhanden ist und über einen Bereich von 189 Aminosäuren eine Sequenzidentität mit einer der Sequenzen von größer 55 % (insbesondere 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%), vorzugsweise mit Sequenz SEQ ID 16 eine Sequenzidentität von größer 81 % oder mit SEQ ID NO 14 von größer 69 % aufweist. Bevorzugt weist das Homologe eine Sequenzidentität mit Sequenz SEQ ID 16 von 83%, 85%, 90% oder 95% oder mit Sequenz SEQ ID 14 von größer 69%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% auf. Der Bereich, der in der Berechnung der Sequenzidentität eingeht, beträgt 189, 250, 300, 350 oder 400 Aminosäuren oder die ganze Länge der Aminosäuresequenz.

Bei dem Mutein handelt es sich um ein natürliches oder rekombinantes Protein, welches in einem Organismus vorhanden ist und über einen Bereich von 189 Aminosäuren eine Sequenzidentität mit einer der Sequenzen von größer 55 % (insbesondere 60%, 65%, 70%,

75%, 80%, 85%, 90%, 95%), vorzugsweise mit Sequenz SEQ ID 16 eine Sequenzidentität von größer 81 % oder mit SEQ ID NO 14 von größer 69 % aufweist. Bevorzugt weist das Mutein eine Sequenzidentität mit Sequenz SEQ ID 16 von 83%, 85%, 90% oder 95% oder mit Sequenz SEQ ID 14 von größer 69%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% auf. Der Bereich, der in der Berechnung der Sequenzidentität eingeht, beträgt 189, 250, 300, 350 oder 400 Aminosäuren oder die ganze Länge der Aminosäuresequenz.

Bei dem Fusionsprotein handelt es sich um ein Protein aufweisend eine Sequenz SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10 12, 14, 16, 18 oder ein Homologes oder Mutein nach der vorgenannten Definition welches mit einem anderen Protein wie dem GFP (GenBank Accession Number BAB11884) oder einem Oligopeptid wie einem Hexahistidin-Anker fusioniert ist. Dies geschieht in der Regel mit bekannten rekombinanten Methoden.

Die Sequenzen SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10 12, 14, 16, 18 sind neu. Das Protein Pellino aus *Drosophila* (GenBank Accession Number, AF091624) stellt möglicherweise ein Homologes dieser Proteine dar, das aufgrund seine Assoziation mit dem Protein pelle identifiziert wurde (Grosshans et al., Mech Dev, 81, 127-38, (1999). Pelle ist assoziiert mit dem Toll / Dorsal Signaltransduktionsweg, der seine analoge Entsprechung im Interleukin-1-Signaltransduktionsweg der Säugetiere hat (Auron, Cytokine Growth Factor Rev, 9, 221-37, 1998). Ferner ist ein Protein bekannt, das sich von dem Protein M30,D (SEQ ID NO 10) durch eine Aminosäure unterscheidet (GenBank Accession Number, AJ278859). Dieses Protein wurde bisher für das menschliche Homologe von Pellino gehalten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein, dessen Transkript mit einer Sonde umfassend einen Sequenzbereich aus den Sequenzen SEQ ID NO 17, 15 13, 11, 9, 7, 5, 3, 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

Unter Transkript wird die zu dem entsprechenden Protein gehörende mRNA oder cDNA verstanden. Das Transkript des erfindungsgemäßen Proteins hybridisiert unter stringenten Standardbedingungen mit einer Sonde, die einen Sequenzbereich aus den Sequenzen SEQ ID NO 17, 15 13, 11, 9, 7, 5, 3, 1 umfaßt. Zur Hybridisierung sind kurze Oligonukleotide von etwa 17 bis 20 Basenpaaren Länge als Sonden zu verwenden. Diese Sonden sollten die konservierten Bereiche der Sequenzen SEQ ID NO 17, 15 13, 11, 9, 7, 5, 3, 1 umfassen. Es

ist aber nicht nötig und in der Regel nicht besonders vorteilhaft, daß die für ein Hybridisierungsexperiment verwendeten Sondenmoleküle eine einheitliche Sequenz aufweisen. Sie können auch durch Primerextension von Restriktionsfragmenten unter Verwendung von Primern mit Zufallssequenzen und einer Polymerase (wie Klenow-DNA-Polymerase) gebildet werden und im statistischen Mittel eine Länge von 17 bis 20 Basenpaaren aufweisen. Der Einsatz von einzelsträngigen RNA- oder DNA-Sonden oder doppelsträngigen DNA-Sonden ist im Rahmen der vorgenannten stringenten Bedingungen möglich. Der Einsatz der vorgenannten Sonden aus Primerextensionsreaktionen ist bevorzugt.

10

Hybridisierung unter stringenten Standardbedingungen bedeutet im Rahmen der Erfindung:

- Die Hybridisierung erfolgt in modifiziertem Church-Puffer (EDTA 1 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,2, 0,5 M, SDS 7 %),
- 15 - Die DNA befindet sich auf einer Nylon-Membran (z.B. ZetaProbe der Fa. BioRad).
- Die Nylonmembran wird ca. 30 min prehybridisiert,
- Danach wird eine markierte in Puffer gelöste Sonde für 24 h zugegeben,
- Die Hybridisierung erfolgt bei 65°C (wenn die Sequenz der Sonde aus derselben Organismenart entstammt wie die zu suchende DNA) oder bei 60°C (wenn die
- 20 Sequenz der Sonde aus einer anderen Organismenart entstammt als die zu suchende DNA),
- Das Waschen der Membran erfolgt bei derselben Temperatur wie Hybridisierung, also bei 65°C bzw. 60°C für 20 min in 5xSSC-Puffer, 0.1% SDS (SSC: siehe Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology), für 20 min in 1xSSC/
- 25 0.1% SDS-Puffer, für 10 min in 0.5xSSC/0.1%SDS Puffer.

Dieses Protokoll kann in einzelnen Punkten abgewandelt werden solange die Stringenz der Hybridisierung im wesentlichen erhalten bleibt. Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current

30 Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds),



1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Antikörper gegen ein Protein der M30-Genfamilie, insbesondere gegen ein Protein aufweisend eine der Sequenzen SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18.

Der Begriff Antikörper umfaßt sowohl polyklonale, monoklonale, humane oder humanisierte oder rekombinante Antikörper oder Antikörperfragmente, single chain  
10 Antikörper oder auch synthetische Antikörper aller Immunglobulinklassen wie IgM, IgG, IgD, IgE, IgA oder ihrer Subklassen. Bevorzugt sind IgG und seine Subklassen wie beispielsweise IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 oder IgGM. Besonders bevorzugt sind die IgG Subtypen IgG1/k oder IgG2b/k. Der Begriff Antikörperfragmente umfaßt alle sich von Antikörpern herleitende Proteinkonstrukte mit einer oder zwei dem Antigen-  
15 komplementären Bindungsstellen, wie Antikörperteile mit einer den von leichter und schwerer Kette gebildeten Bindungsstelle wie Fv-, Fab- oder F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente oder Einzelstrangfragmente. Bevorzugt sind verkürzte Doppelstrangfragmente wie Fv-, Fab- oder F(ab')<sub>2</sub>. Diese Fragmente können beispielsweise auf enzymatischem Wege durch Abspaltung des Fc-Teils der Antikörper mit Enzymen wie Papain oder Pepsin, durch  
20 chemische Oxidation oder durch gentechnische Manipulation der Antikörpergene erhalten werden.

Die Herstellung polyklonaler Antikörper durch Immunisierung eines Säugetiers mit dem  
25 Antigen oder einem Fragment davon ggf. unter Verwendung eines Adjuvans (wie Freund'sches Adjuvans) ist seit langem bekannt. Gleiches gilt für die aufwendigere Herstellung von monoklonalen Antikörpern aus Maushybridomazellen nach dem Verfahren von Köhler und Milstein (siehe z.B. J Immunol Methods 1995, 186(1):17-25). Inzwischen lassen sich auch rekombinante Antikörper routinemäßig herstellen (siehe EP-B  
30 0 368 684; Kipriyanow & Little, Molecular Biotechnology, Vol 12, 1999, 173-201). Es gibt mit fließenden Übergängen zwei Arten der Herstellung rekombinanter Antikörper. Zum einen kann man von bereits mit dem Antigen oder einem Fragment davon immunisierten

Zellen ausgehen, die variablen und ggf. die konstanten Bereiche amplifizieren und die erhaltene Sequenz in einen Vektor inserieren, der die übrigen noch benötigten konstanten Sequenzen enthält, so daß der mit Hilfe des Vektors produzierte rekombinante Antikörper ein Fusionsprotein, eine Chimäre darstellt. Diese Zellen können Hybridoma aus dem Verfahren nach Kohler & Milstein sein oder Lymphocyten, die aus einem Tier nach Immunisierung erhalten wurden. Zumindest im letzten Fall muß zum Erhalt eines Monoklons noch nach dem Antikörper mit der höchsten Affinität gesucht werden (Überblick: Harlow, E. and Lane, D. 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; Ausubel et al., (eds), 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York). Im einzelnen stellt sich die Isolation von Antikörpergenen wie folgt dar. Es werden Antikörper-produzierende Zellen angezogen und die mRNA bei ausreichender optischer Dichte der Zellen über Zellyse mit Guanidiniumthiocyanat, Ansäuern mit Natriumacetat, Extraktion mit Phenol, Chloroform/Isoamylalkohol, Fällungen mit Isopropanol und Waschen mit Ethanol aus den Zellen in bekannter Weise isoliert. Anschließend wird mit Hilfe der Reversen Transcriptase cDNA aus der mRNA synthetisiert. Die cDNA kann direkt oder nach genetischer Manipulation beispielsweise durch zielgerichtete Mutagenese, Einführung von Insertionen, Inversionen, Deletionen oder Basenaustausche in geeignete tierische, pilzliche, bakterielle oder virale Vektoren inseriert und in den entsprechenden Wirtsorganismen exprimiert werden. Bevorzugt werden bakterielle oder Hefe Vektoren wie pBR322, pUC18/19, pACYC184, Lambda oder Hefe-mu-Vektoren zur Klonierung der Gene und die Expression in Bakterien wie E. coli bzw. in der Hefe wie Saccharomyces cerevisiae.

Ein anderes Verfahren besteht in dem Durchsuchen einer natürlichen oder synthetischen Antikörperbibliothek. Eine solche Bibliothek kann zum Beispiel nach dem Verfahren nach US-A 5 840 479 erstellt werden, zum Beispiel durch Trinukleotidsynthese der variablen Bereiche.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines Proteins der M30-Genfamilie zur Suche nach Liganden, die an diese Proteine binden, sowie diese Liganden selbst.

Ein Ligand ist im Rahmen der Erfindung ein Molekül eines Molekulargewichts von bis zu 100 bis 100000 Da, das an ein Protein der M30-Genfamilie mit einer

Dissoziationskonstante von kleiner 1  $\mu\text{M}$  bindet. Es kann sich also um ein kleines organisches Molekül von 200 bis 1000 Da handeln oder auch um ein erheblich größeres Polymer, wie ein Oligopeptid, Polypeptid oder Protein mit einem Molekulargewicht von 1000 bis 100000 Da, insbesondere von 40000 bis 60000 Da. Vorzugsweise ist die Dissoziationskonstante des Ligand-Protein-Komplexes kleiner 100  $\mu\text{M}$ , vor allem kleiner als 10 nM, insbesondere kleiner 1 nM, wobei der Bindung in der Regel ein Bindungsgleichgewicht nach Scatchard zugrunde zu legen ist (C.R. Cantor und P.R. Schimmel, Biophysical Chemistry, W.H. Freeman and Company, San Francisco, Vol. III, Kapitel 15-3 und 15-4; ferner Scatchard, G, 1949, Ann. N. Y. Acad. Sci 51:660). Die Dissoziationskonstante wird mit Hilfe bekannter Methoden bestimmt. Entweder wird der Ligand markiert (z.B. radioaktiv) und es wird die Einstellung des Bindungsgleichgewichts direkt gemessen oder es wird die Verdrängung eines zweiten Liganden gemessen, dessen Dissoziationskonstante bekannt ist, um dann anhand bekannter mathematischer Beziehungen auf die Dissoziationskonstante des ersten Liganden zurückzurechnen. Das letztere ist allerdings nur dann möglich, wenn die Dissoziationskonstanten beider Liganden nicht zu weit auseinanderliegen. Ein Testsystem könnte also wie folgt aussehen. M30 bindet an M32 oder an M33. Man könnte folglich eines von beiden Proteinen markieren und das jeweils andere Protein immobilisieren, um dann die Verdrängung des markierten Interaktionspartners messend verfolgen. Der Zerfall oder sonstige Strukturveränderungen des supramolekularen M30/M32-Komplexes oder des M30/M33-Komplexes bei Zugabe eines putativen Liganden können auch mit üblichen physikalischen Meßverfahren verfolgt werden (z.B. NMR, Circular dichroismus, Lichtstreuung; siehe Cantor und Schimmel, am angegebenen Ort, Vol. II, Kapitel 8 und Galla, H.J., Spektroskopische Methoden in der Biochemie, Thieme Verlag, Stuttgart, 1988 Kapitel 8 ). Weitere Proteine, die Wechselwirkungspartner von M30 oder anderen Mitgliedern der M30-Genfamilie darstellen und die von dem Begriff des Liganden mitumfaßt sind, können mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems ermittelt werden (so wie in einem Beispiel für M32 beschrieben). Die Verwendung des Yeast-Two-Hybrid-Systems zur Ermittlung von Liganden ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Außerdem könnte man die Interaktion beide Proteine im Rahmen des supramolekularen Komplexes mit FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, siehe auch unter „Förster

Theorie des Singulett-Singulett Energietransfers“, Cantor und Schimmel, am angegebenen Ort, Vol. II, Kapitel 8-2). Dies könnte wie folgt geschehen. M30 und sein Interaktionspartner könnten in Fusion mit Mutanten des Green Fluorescent Proteins (GFP) [z.B. BFP (blue fluorescent protein) GFP, CFP oder YFP (green fluorescent protein, S65T Mutante) (*Mahajan, et al., Nat Biotechnol, 16, 547-52, (1998)*)] kloniert werden. Im  
5 folgenden seien BFP und GFP beispielhaft herausgegriffen. Diese Fusionsproteine werden in Bakterien oder anderen Expressionssystemen (Baculoviren, Hefen) exprimiert und aufgereinigt, z.B. über einen Polyhistidin-Marker unter Verwendung von Nickelsäulen. Die beiden Proteine gibt man in einer Konzentration im Bereich von 100 nM zusammen.  
10 BFP ist hierbei der Donor (Excitation bei 389 nm) und GFP der Akzeptor (Emission bei 511 nm). Der FRET Effekt tritt bei Annäherung der beiden Proteine auf 50 – 10 Angström auf. Die Proteinmischung kann in Microtiterplatten pipettiert werden, und mit Substanzen einer chemischen Bank inkubiert werden. Dabei kann es auch von Vorteil sein, zunächst das M30-Fusionsprotein mit der chemischen Substanz vorzuinkubieren, und danach den  
15 Interaktionspartner zuzugeben. Eine Inhibition der Interaktion lässt sich dann über eine Abnahme des FRET-Effektes feststellen (Messung mit Photomultiplier oder Spektralphotometer). Eine Implementation eines High-throughput-screening Systems unter Ausnutzung des FRET-Effektes ist in (*Mere, et al., Drug Discov Today, 4, 363-369, (1999)*) beschrieben. Dieses Testsystem kann prinzipiell auch in Zellen erfolgen, unter  
20 Umständen ist dies erforderlich.

Die Suche nach neuen Liganden könnte auch im Rahmen eines HTS-Systems (High Throughput System). unter Benutzung des SPA (Scintillation Proximity Assays) (Fa. Amersham) durchgeführt werden. Dabei wird ein Peptid des putativen Interaktionspartners  
25 von M30 oder einem anderen Vertreter der M30-Genfamilie an SPA-beads gekoppelt. Ein Fusionsprotein aus M30 oder einem anderen Vertreter der M30-Genfamilie und der Konsensusphosphorylierungsstelle der Protein-Kinase-A (Sequenz RRASV) und einem Aufreinigungstag (z.B. Polyhistidintag) wird hergestellt und aufgereinigt. Durch Inkubation mit Proteinkinase A und <sup>33</sup>P-ATP wird das M30 Fusionsprotein mit <sup>33</sup>P  
30 markiert. Die SPA-beads können im Microtiterformat mit Substanzen aus einer kombinatorischen library inkubiert werden. Nach Zugabe des Fusionsproteins kann das radioaktive Signal, das durch die Bindung des <sup>33</sup>P-markierten Fusionsproteins an den SPA-

bead gebildet wird, gemessen werden. Die Zugabe eines Liganden würde die nach Durchführung der Waschschrirte an den SPA-Beads meßbare Radioaktivität herabsetzen.

5 Auch mit Hilfe gängiger Interaktionsscreeningverfahren wie dem Yeast-Two-Hybrid System (Lottspeich und Zorbas, Bioanalytik, 1998, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Kapitel 34), dem Durchsuchen von Expressionsbibliotheken mit dem lambda-gt11-System und Co-Immunpräzipitationsverfahren können weitere Liganden der Proteine der M30-Genfamilie identifiziert werden. Ein Yeast-Two-Hybrid Verfahren kann beispielsweise unter Benutzung des Matchmaker-Systems der Clontech Laboratories  
10 GmbH Heidelberg, DE erfolgen. Dazu wird eine Nukleinsäure, codierend für ein Protein der M30-Genfamilie in einen sog. Bait-Vektor kloniert (z.B. pGBT10). Eine Bibliothek aus einem sog. Prey-Vektor und verschiedenen darin enthaltenen Genstücken (z.B. eine in den Prey-Vektor einklonierte fötale Gehirnbank) kann dann nach einem Interaktionspartner durchsucht werden (siehe z.B. (Kuner, et al., Science, 283, 74-7, (1999))).

15

Die gestellte Aufgabe bezüglich neuer therapeutischer Strategien zur Therapie neurodegenerativer Erkrankungen wird weiterhin dadurch gelöst, daß durch die erfindungsgemäße Interaktion zwischen M30 und Proteinkinasen der IRAK-Familie M30 und seine Homologen erstmals funktionell mit Signaltransduktionswegen in Verbindung  
20 gebracht werden, die letztlich zum Zelltod führen. Weitere Beweise für einen Zusammenhang zwischen M30 und diesen Signaltransduktionswegen zeigt Beispiel 7, in dem ein vergleichender Apoptose-Assay für M30-transfizierte bzw. nicht mit M30 transfizierte Zellen durchgeführt wird. Bei einer gleichzeitigen Überexpression von M30 in der Zelle zeigte sich hierbei gegenüber den nicht überexprimierenden Kontrollzellen eine  
25 deutlich verstärkte Apoptose unter Einfluß von Staurosporin.

Aus diesen erfindungsgemäßen Daten läßt sich schließen, daß die Interaktion von M30 mit IRAK-1 bzw. seinen Homologen und Derivaten die Funktion dieser Proteinkinasen im Signaltransduktionsweg beeinflussen sollten. Weitere Liganden von M30, die durch ihre  
30 Bindung an M30 bestimmte Bereiche von M30 maskieren, könnten die Interaktion von M30 zu diesen Proteinkinasen (IRAK-Familie und ihre Homologen und Derivate) daher

beeinträchtigen oder verstärken und somit letztlich das Ausmaß des neuronalen Zelltods unter Streßbedingungen beeinflussen.

Bestimmte Liganden von M30 eignen sich daher zur Herstellung von Arzneimitteln zur  
5 Therapie neurodegenerativer Erkrankungen, weil sie durch die Verstärkung bzw. Unterbindung der Interaktion zwischen M30 und IRAK- Kinasen bestimmte Signaltransduktionswege beeinflussen, die Apoptose-Vorgänge auslösen und verstärken können.

Solche Liganden zur Herstellung von Arzneimitteln zur Therapie neurodegenerativer  
10 Erkrankungen sind daher Gegenstand dieser Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist die Verwendung der Interaktion von M30 mit Proteinkinasen, bevorzugt mit Proteinkinasen der IRAK-Genfamilie und ihrer Homologen und Derivate zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie neurodegenerativer  
15 Erkrankungen.

Unter Derivaten von Proteinkinasen der IRAK-Genfamilie werden insbesondere solche Mitglieder der Familie verstanden, die posttranslational modifiziert wurden.

20 Weiterhin sind auch Arzneimittel Gegenstand der Erfindung enthaltend einen funktionalen Inhibitor von M30 oder einem Homologen von M30. Unter solchen Inhibitoren werden Liganden verstanden, die an M30 binden und die die Funktion von M30 beeinflussen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung liegt in einem Screening-Verfahren zur  
25 Identifikation und/oder zur Charakterisierung von funktionalen Inhibitoren von M30 oder einem Homologen von M30, umfassend die folgenden Schritte:

a) Bereitstellung von Zellen, die M30 oder eines seiner Homologen überexprimieren.

30 b) Behandlung dieser Zellen mit einer Apoptose-auslösenden Substanz, insbesondere mit Staurosporin,

- c) Behandlung eines Anteils der Zellen aus b) mit einer Substanz mit vermeintlicher Inhibitor-Funktion bezüglich M30 oder bezüglich eines seiner Homologen, während die restlichen Zellen aus b) unbehandelt bleiben,
- d) Durchführung eines vergleichenden Apoptose-Assays bei Extrakten aus Zellen, die nach c) mit einem Inhibitor-Kandidaten bzw. nicht mit einem Inhibitor-Kandidat behandelt wurden,
- wobei die Behandlung der Zellen nach b) gleichzeitig mit der Behandlung nach c) oder die Behandlungen nach b) und c) in beliebiger Reihenfolge nacheinander erfolgen können.

10

In Beispiel 14 wird das Yeast-Two-Hybrid-System für Kotransformationsexperimente zum Nachweis einer Protein/Protein-Interaktion zwischen m30 mit Proteinkinasen des Ill-Signaltransduktionsweges genutzt. M30 wurde hierbei in den sogenannten Prey-Vektor einkloniert, während in den Bait-Vektor entweder die Proteinkinase *pelle* aus *Drosophila* oder aber der humane IRAK1-Rezeptor (interleukin-receptor-associated-kinase 1) einkloniert wurde. Protein/Protein-Interaktionen konnten mit Hilfe des yeast-two-hybrid-assays zwischen m30 und *pelle* detektiert werden. Die Interaktion von M30 mit IRAK-1 ist schwächer als die mit *pelle* und läßt sich nur mit den N-terminalen zwei Dritteln des M30-Leserasters nachweisen. Das spricht dafür, daß der wahre Interaktionspartner von m30 entweder eine posttranslational modifizierte Version von IRAK-1 oder aber eine zu IRAK-1 homologe Kinase ist.

20

Die erfindungsgemäße Interaktion von M30 mit IRAK-ähnlichen Proteinkinasen beeinflusst in der Regel die Funktion der IRAK-ähnlichen Proteinkinasen, indem sie die Interaktion dieser Kinasen mit anderen Proteinen, z.B. Phosphorylierungstargets beeinflussen, oder die Aktivierung der Kinase-Funktion beeinflussen können. Durch die beschriebene Dimerisierungsfunktion von M30-Familienmitgliedern ist beispielsweise eine Aktivierung der Kinasen durch Approximierung und gegenseitige Phosphorylierung möglich.

25

Die M30-Liganden *pelle* und deren humane Analoga aus der IRAK-Familie, sowie deren Derivate, insbesondere aber IRAK1, sind somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

30

Das Durchsuchen von Expressionsbanken im lambda-gt11-System und anderen Phagensystemen kann anhand gängiger Protokolle (Ausubel et al., Protocols in Molecular Biology, New York, 1997) erfolgen. Ähnliche Assays, die auf dem Prinzip einer Interaktionsinhibition beruhen, sind für den hier verfolgten Ansatz gleichwertig, und  
5 können ebenfalls eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Liganden, insbesondere die Liganden *pelle* und die Proteinkinasen der IRAK-Familie, beeinflussen in der Regel die Funktion der Proteine der M30-Genfamilie, indem sie die Konformation der Proteine und Proteinkomplexe verändern oder  
10 Bindungsstellen für andere Liganden maskieren (z.B. durch sterische Hinderung oder durch Änderung des Hydrophobizitätsverhaltens einer Domäne bzw. des ganzen Proteins oder Proteinkomplexes oder durch elektrostatische Abstoßung). Diese Beeinflussung kann mit einer Inhibierung oder Aktivierung bestimmter Funktionen der Proteine der M30-Genfamilie einhergehen.

15 Die auf diese Weise gefundenen Liganden, insbesondere aber die Liganden *pelle* und die Proteinkinasen der IRAK-Familie, können für die Herstellung von Medikamenten benutzt werden, die gegen neurodegenerative Erkrankungen und/oder Erkrankungen des Immunsystems und/oder gegen Karzinome oder Sarkome einsetzbar sind. Unter  
Erkrankungen des Immunsystems sind insbesondere Autoimmunerkrankungen, Atopien  
20 und Allergien, insbesondere mit Lungenbeteiligung wie Asthma bronchiale, Infektion durch HIV oder durch andere immunotrope Viren, akute und chronische lymphatische Leukämien, akute und chronische myeloische oder lymphatische Leukämien, primär chronische Polyarthrit, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa zu verstehen. Karzinome oder  
Sarkome sind insbesondere Bronchialkarzinome, Colonkarzinome, Leukämien, Cervix-  
25 und Uteruskarzinome und vor allem Ovarialkarzinome.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein DNA-Konstrukt, umfassend Nukleinsäure codierend für ein Protein der M30-Genfamilie und einen operativ damit verknüpften  
30 Promotor.

Die Promotoren, die den für Proteine der M30-Genfamilie codierenden Nukleotidsequenzen vorgeschaltet sind und deren Transkription regulieren, können durch



- ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere heterologe oder auch synthetische Promotoren ausgetauscht werden. Promotoren können die Transkription eines für ein oder für mehrere Proteine codierenden Nukleinsäureabschnitts regulieren. Im letzteren Fall kommen bei Eukryonten Wirtszellsystemen in der Regel interne Ribosomenbindungsstellen (IRES) zum Einsatz.
- 10 Zur Herstellung der erfindungsgemäßen DNA-Konstrukte werden üblicherweise die für ein Protein der M30-Genfamilie codierenden Nukleinsäureabschnitte mit genetischen Regulationselementen wie Transkriptions- und Translationssignalen funktionell verknüpft. Diese Verknüpfung kann je nach gewünschter Anwendung zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Genexpression führen. Mit den solchermaßen hergestellten rekombinanten Nukleinsäurekonstrukten werden anschließend Wirtsorganismen transformiert. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Konstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt, es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Sequenzen inseriert und der natürliche Promotor wird nicht entfernt. Stattdessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Auch am 3'-Ende der Nukleinsäure-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte regulatorische Elemente inseriert werden. Die offenen Leseraster können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein, oder auf getrennten Genkonstrukten lokalisiert sein. Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, l-PR- oder im l-PL-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren wie amy und SPO2, in den Hefepromotoren wie ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH oder in Mammaliapromotoren wie CaM-KinaseII, CMV, Nestin,
- 15  
20  
25  
30

L7, BDNF, NF, MBP, NSE, beta-Globin, GFAP, GAP43, Tyrosin Hydroxylase, Kainat-Rezeptor-Untereinheit 1, Glutamat-Rezeptor-Untereinheit B enthalten. Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft  
5 verwendet werden. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression  
10 positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird. Unter "Enhancer" sind beispielsweise DNA-Sequenzen zu  
15 verstehen, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte Expression bewirken. Als weitere Regulationssequenzen seien beispielhaft die Locus-Control-Regions, Silencer oder jeweilige Teilsequenzen davon genannt, wobei diese Sequenzen so gewählt werden, daß eine gewebespezifische Expression möglich ist. Eine bevorzugte Ausführungsform ist die Verwendung eines  
20 Promotors 5'-wärts vom offenen Leseraster, gegebenenfalls mit weiteren Regulationssignalen wie 3'-wärts gelegene Terminatoren oder Polyadenylierungssignale oder Enhancer. In der Regel wird die für ein Protein der M30-Genfamilie codierende Sequenz in einen Framework-Vektor einkloniert, der alle benötigten regulativen Sequenzen aufweist und die Möglichkeit zur Selbstreplikation in einem Wirtsorganismus  
25 besitzt. Geeignete Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Sindbisvirus, Transposons, IS-  
30 Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden. Für die Integration in Mammalia wird vorteilhaft lineare DNA

verwendet. Die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bzw. des rekombinanten Nukleinsäurekonstrukts kann vorteilhaft durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Genexpression positiv beeinflussen, erhöht werden. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem stärkere Transkriptionssignale wie Promotoren und Enhancer verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert, oder die Ableseeffizienz dieser mRNA an den Ribosomen erhöht wird. Zur Erhöhung der Genkopienzahl können die Nukleinsäuresequenzen oder homologe Gene, beispielsweise ein Nukleinsäurefragment bzw. in einen Vektor eingebaut werden, der vorzugsweise die den jeweiligen Genen zugeordnete, regulatorische Gensequenzen oder analog wirkende Promotoraktivität enthält. Insbesondere werden solche regulatorische Sequenzen verwendet, die die Genexpression verstärken. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können zusammen mit den für interagierende Proteine kodierenden Sequenzen in einen gemeinsamen Vektor kloniert werden und anschließend in dem gewünschten Organismus exprimiert werden. Alternativ kann auch jede der potentiell interagierenden Nukleinsäuresequenzen und die für ein Mitglied der M30-Genfamilie kodierenden Sequenzen in je einen einzelnen Vektor gebracht und diese getrennt in den jeweiligen Organismus über übliche Methoden wie Transformation, Transfektion, Transduktion, Elektroporation oder Partikel-Gun eingebracht werden. Es können Vektorsysteme oder Oligonukleotide verwendet werden, die die Nukleinsäuren oder das Nukleinsäurekonstrukt um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern, also ein Fusionsprotein erzeugen, um das Protein leichter reinigen zu können. Als solche „Tags“ sind in der Literatur z. B. Hexa-Histidin -Anker bekannt oder Epitope, die als Antigene verschiedener Antikörper erkannt werden können (Studier et al., Meth. Enzymol., 185, 1990: 60 - 89 und Ausubel et al. (eds.) 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß M30 unter Streßbedingungen eine zelltodfördernde Wirkung besitzt (Beispiel 7). Diese Erkenntnis ließ sich aus der Durchführung vergleichender quantitativer Apoptose-Assays an Zellen, die M30 überexprimieren bzw. nicht überexprimieren, schließen. Demnach wird die Expression der

Gene der M30-Familie unter Streßbedingungen - z.B. unter den Bedingungen eines Schlaganfalls- nicht nur hochreguliert, sondern die M30-Genprodukte sind vermutlich auch an den Folgen des Schlaganfalls, die zum neuronalen Zelltod führen, beteiligt.

Diese erfindungsgemäße Erkenntnis unterstreicht die Bedeutung der Proteine der M30-Familie als pharmakologische Targets bzw. die Anwendung von funktionalen M30-Inhibitoren bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung liegt daher in der Verwendung eines Inhibitors für M30 oder für eines seiner Homologen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen unter Reduktion des neuronalen Zelltods.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein DNA-Konstrukt, umfassend einen Promotor und eine mit dem Promotor operativ verknüpfte Sequenz zur Kontrolle der Neusynthese des Proteins der M30-Genfamilie in einer Zelle. Dies erfolgt durch Komplexbildung mit der korrespondierenden mRNA.

Dieses Konstrukt dient der Kontrolle der Neusynthese des Proteins der M30-Genfamilie in einer Zelle. Dazu wird eine Gensequenz, die zu einer Sequenz eines Gens der M30-Genfamilie oder einem Teil davon invers komplementär ist, vor einen Promotor kloniert, so daß die Transkription der Sequenz unter der Kontrolle dieses Promotors steht. Wird das Konstrukt in eine Zelle eingebracht, dann wird gegebenenfalls nach Induktion des Promotors das Transkript der zu einer Sequenz eines Gens der M30-Genfamilie oder einem Teil davon invers komplementären Gensequenz gebildet. Dieses Transkript bildet mit dem Transkript des betreffenden Gens der M30-Genfamilie eine RNA-RNA-Hybridhelix, die durch Nucleasen der Zelle beschleunigt abgebaut wird. Das Transkript der invers komplementären Sequenz bewirkt also eine Herabsetzung der Lebensdauer der Transkripte, an die es bindet. Solche erfindungsgemäßen Konstrukte sind nützlich, um die Transkriptionsfrequenz von Genen der M30-Genfamilie in den Zellen, die das Konstrukt aufweisen, zu drosseln und im Extremfall gänzlich zu unterdrücken.

Konstrukte, die die in einer Zelle vorhandene Menge an Protein eines Mitglieds der M30-Genfamilie erhöhen oder herabsetzen, können auch im Rahmen der Gentherapie verwendet werden, um Zellen, die eine pathologische Menge des betreffenden Proteins aufweisen, zu heilen. Dies kann im Rahmen einer Therapie neurodegenerativer Erkrankungen geschehen

oder zum Beispiel auch zur Bekämpfung von Krebs, das heißt von Sarkomen und Karzinomen. Eine solche Verwendung beider erwähnter Arten von Konstrukten ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Es versteht sich von selbst, daß Zellen, die eines der vorgenannten Konstrukte enthalten, ebenfalls ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind. Diese Zellen können prokaryotisch oder eukaryotisch sein. Als Zellen sind prinzipiell alle Organismen denkbar, die eine Expression der erfindungsgemäßen Konstrukte ermöglichen. Unter Zellen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien wie *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* oder *Pseudomonas*, eukaryotische Mikroorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, höhere eukaryotische Zellen aus Mensch oder Tier, beispielsweise COS-, Hela-, HEK293-, Sf9- oder CHO-Zellen.

Eine gängige Möglichkeit zur Beeinflussung von Transkript- und damit Proteinmengen von M30 besteht im Einsatz von kurzen Nukleinsäuresequenzen oder Oligonukleotiden. Darunter zu verstehen sind alle Nukleinsäurefragmente im Bereich von 10 bis 200 bp, synthetisch erzeugt, oder auf andere Weise zu erhalten. Im Besonderen sind dies antisense-Oligonukleotide gerichtet gegen Teilsequenzen der M30 mRNA, oder auch Nukleinsäuren im Sinne von RNAi Inhibierung. Die eingesetzten Nukleinsäuren können auch chemisch modifiziert sein, beispielsweise Phosphothioat-Oligonukleotide, oder sie können Hybride aus Ribo- und Desoxyribonukleinsäuren sein. Diese Oligonukleotide können auch in unterschiedlichen Applikationsformen in Zellen eingebracht werden, z.B. mit Liposomen-Präparationen, mit Anteilen des VSV-Virus oder ähnlicher Präparationen.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein transgenes nichtmenschliches Wesen, aufweisend Zellen mit einem veränderten Gen in dem Genom der betreffenden Zelle, das das Wildtypgen vorzugsweise ersetzt, wobei der Wildtyp des Gens für ein Protein der M30-Genfamilie codiert.

30

Transgene nichtmenschliche Wesen sind transgene Tiere oder Pflanzen.

Transgene Wesen sind genetisch so verändert, daß ihre Zellen eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Menge eines Proteins der M30-Genfamilie aufweisen oder bei denen

die Wildtyp-Form eines Gens der M30-Genfamilie durch ein anderes Gen vorzugsweise durch homologe Rekombination ersetzt wird, das sich vom Wildtyp-Gen im offenen Leseraster oder in den Regulationssequenzen, die die Transkription des primären Genproduktes regulieren (Promotor, Enhancer usw.), unterscheiden. Dementsprechend weist das transgene Wesen ein anderes Protein der M30-Genfamilie auf und/oder die Menge an diesem Protein ist in allen Zellen oder einem Teil der Zellen des Wesens dauerhaft oder vorübergehend verändert. Transgene Wesen können auch in bezug auf das mutierte Gen Mosaikwesen sein, das mutierte Gen kann in nur einem Teil der somatischen Zellen vorliegen, es ist begriffsmäßig nicht erforderlich, daß die Mutation in den Keimzellen manifest ist. Insoweit können bestimmte Menschen, die erfolgreich einer Gentherapie unterzogen wurden, unter Umständen auch zu den transgenen Wesen gezählt werden. Aus diesem Grund erfolgt durch den Zusatz des Begriffs „nichtmenschlich“ ein expliziter Ausschluß vom Schutz. Das mutierte Gen des transgenen Wesens kann auch ein Knock-out Gen sein (Ausubel et al. (eds.) 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York und Torres et al., (eds.) 1997, Laboratory protocols for conditional gene targeting, Oxford University Press, Oxford).

Transgene Tiere können zum Beispiel Mäuse, Ratten, Schafe, Rinder oder Schweine sein. Auch transgene Pflanzen sind im Prinzip denkbar, wenn auch das Verfahren der homologen Rekombination zur deren Erzeugung in der Regel ausscheiden wird, da die evolutionsbedingten Unterschiede zwischen Pflanzen und Säugetieren dies in der Regel nicht zulassen werden. Zum Beispiel können transgene Pflanzen zur Expression großer Mengen von Protein für ein Verfahren zur Suche von Liganden, die an ein Protein der M30-Genfamilie binden (siehe Luhring, H., Witzemann, V., FEBS Lett, 1995, 361(1):65-9) herangezogen werden.

Über transgene Überexpression oder genetische Mutation (Nullmutation oder spezifische Deletionen, Insertionen oder Veränderungen) durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen kann man Tiermodelle erzeugen, die wertvolle weitere Informationen über die (Patho-)Physiologie der Gene der M30-Genfamilie liefern.

Solchermaßen hergestellte Tiermodelle können Testsysteme zur Evaluierung neuartiger Therapeutika für Pharmaka zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen liefern.

5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Diagnose einer neurodegenerativen Krankheit oder der Anfälligkeit gegenüber dieser Krankheit, gekennzeichnet durch die Sequenzabweichung in einem Gen, das für ein Protein der M30-Genfamilie codiert, gegenüber dem Wildtyp.

Es wurde gefunden, daß die Gene der M30-Genfamilie bei neurodegenerativen Zuständen eine wichtige Rolle spielen. Dies legt nahe, daß das Auftreten dieser Zustände oder  
10 zumindest die Anfälligkeit dafür in bestimmten Fällen auf eine Mutation in einem Protein der M30-Genfamilie zurückzuführen ist. Es wird also ein Verfahren zur Diagnose einer neurodegenerativen Erbkrankheit oder der Anfälligkeit gegenüber dieser Krankheit angegeben, das die Ermittlung von Sequenzabweichungen in bezug auf ein oder mehrere  
15 Gene der M30-Genfamilie von dem jeweils korrespondierenden Wildtyp-Gen einschließt. Diese Sequenzabweichungen können zum Beispiel Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNP) sein. Je mehr und je gravierender die Abweichungen sind, desto eher wird der betreffende Patient an einer neurodegenerativen Erkrankung erkranken. Auch kann man das erfindungsgemäße Verfahren anwenden, um die Diagnose bei einem bereits erkrankten  
20 Patienten zu stellen. Verfahren zur Ermittlung von Sequenzabweichungen sind dem Fachmann bekannt. Neben der Polymerasekettenreaktion (PCR) mit anschließender Sequenzierung der Amplifikationsprodukte haben sich einige ähnliche Verfahren etabliert, speziell, wenn bereits bekannt ist, wo die Sequenzabweichungen zu erwarten sind.

Die Korrelation des chromosomalen Locus beim Menschen (Chromosom 2 bei M30; Chromosom 11 bei M31, jeweils beim Menschen) zu bestimmten erblichen Erkrankungen  
25 könnte außerdem ein neues Diagnoseverfahren für erbliche Erkrankungen (z.B. aus dem Formenkreis der Atopien oder anderer Erkrankungen des Immunsystems) ermöglichen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Diagnose von Karzinomen  
30 oder Sarkomen, insbesondere von Ovarialkrebs, gekennzeichnet durch den Nachweis der Überexpression eines Proteins nach SEQ ID NO 14 in einer Körperprobe.

Es wurde gezeigt, daß das Protein nach SEQ ID NO 14, also M31, in Sarkomen und/oder Karzinomen überexprimiert wird, was sich in einer erhöhten Menge des Transkripts des Proteins in den Zellen äußert. Man kann also die Überexpression entweder durch Bestimmung der Transkriptmenge oder der M31-Proteinmenge der Zelle feststellen und bei Vorliegen der Überexpression auf eine maligne Entartung der betreffenden Zelle schließen. Die Bestimmung der Überexpression erfolgt durch den Vergleich der Probe mit einer Kontrollprobe, die keine Krebszellen ausweist und zwar bevorzugt histologisch unter Einsatz von Antikörpern zur Bestimmung der Proteinmenge oder von *in situ*-Sonden zur Bestimmung der Transkriptmengen. Im übrigen kann der Nachweis des Transkripts auch mit PCR-Verfahren erfolgen. Es sind schon einige Krebsmarker zum Beispiel aus WO94/12881 und WO94/17414, DE-A19829473 bekannt, deren Offenbarung in bezug auf die Nachweisprotokolle vollinhaltlich aufgenommen wird. Die bereits bekannten Krebsmarkern können nur eine Untergruppen von Krebszellen nachweisen. Es gibt also immer noch Krebsarten, die sich nicht mit den bekannten Markern nachweisen lassen. Insofern besteht nach wie vor ein Bedürfnis an der Bereitstellung neuer Krebsmarker.

Die Erfindung wird durch die nachfolgende Zeichnung näher beschrieben, wobei

**Fig. 1** die genomische Organisation des M30 Lokus beim Menschen,

**Fig. 2** eine Sequenzzusammenstellung einiger Mitglieder der M30-Genfamilie,

**Fig. 3** die gewebespezifische Expression von M30, Ratte,

**Fig. 4** die Hochregulation der Synthese des M30-Transkripts durch Kainat (M30, Ratte),

**Fig. 5** die Lokalisation von M30 im Rattenhirn nach Verabreichung von Kainat,

**Fig. 6** die Hochregulation der Synthese des M30-Transkripts durch fokale cerebrale Ischämie (M30, Maus),

**Fig. 7** molekulare Funktionen von M30 im IL-1 System,

**Fig. 8** die Sequenzidentitäten, die humanen Vertreter der M30-Genfamilie untereinander aufweisen,

**Fig. 9** Sequenzidentitäten, die Vertreter der M30-Genfamilie aus Mensch und Ratte im Vergleich mit der Pellino-Sequenz aus *Drosophila* aufweisen.

**Fig. 10** Westernblot von cos1-Zellen, die mit m30 und verschiedenen Kontrollen (EGFP; Leervektor) transfiziert wurden, unter Staurosporin-Einfluß bzw. ohne Staurosporin-Einfluß.



**Fig. 11** Position der m30-Fragmente, die für die in Beispiel 14 beschriebenen Kotransformationsexperimente benutzt wurden, auf Nukleotidebene. zeigt.

- 5 **Fig. 1** zeigt die genomische Organisation des M30 Lokus beim Menschen. Dargestellt sind in Fig. 1 die 4 gefundenen cDNA-Spezies von M30 beim Menschen, und ihre genomische Herkunft. Die Exons sind mit großen arabischen Ziffern gekennzeichnet. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Klone noch weiter nach 5' extendieren. Die Größenverhältnisse sind nicht masstabsgetreu. Querstriche bezeichnen unklare Intronlängen. Die
- 10 Bezeichnungen hm30\_A, hm30\_B, hm30\_C und hm30\_D entsprechen jeweils M30,A,B,C,D (siehe Tabelle 1). **Fig. 2** zeigt ein Alignment einiger Mitglieder der M30-Genfamilie. M30 Proteinsequenzen aus Ratte (rat) und Mensch (human (D) entspricht M30, D) wurden mit Homologen aus anderen Spezies nach Homologiebereichen verglichen (MegAlign). **Fig. 3** zeigt die gewebespezifische Expression von M30 (Ratte).
- 15 Ein Northernblot mit RNA aus verschiedenen Geweben wurde mit einer spezifischen Sonde für M30 hybridisiert. Eine RNA-Spezies mit ca. 2.8 kb wird detektiert. (brain = Gehirn; liver = Leber; lung = Lunge; heart = Herz; kidney = Niere; Skl. muscle = Skelettmuskulatur; small intestine = Dünndarm; testis = Hoden, rat m30 = M30, Rattus)
- 20 **Fig. 4** zeigt die Hochregulation der Synthese des M30-Transkripts durch Kainat (rat m30 = M30, Ratte). RNA aus Hippocampusgewebe der Ratte wurde nach verschiedenen Zeiten einer Behandlung mit PBS (Phosphate Buffered Saline), Kainat, oder Pentylentetrazol (PTZ) gewonnen. Ein Northernblot mit dieser RNA wurde mit einer M30-spezifischen Probe hybridisiert. Es zeigt sich eine ubiquitäre Expression in allen untersuchten Geweben. Erklärung im Text der Beispiele **Fig. 5** zeigt die Lokalisation von M30 im Rattenhirn nach
- 25 Verabreichung von Kainatgabe. *In-situ* Hybridisierung der Hippocampusregion in der Ratte 1.5 h nach Gabe von Kainat (10 mg/kg i.p.). Erklärung im Text der Beispiele **Fig. 6** zeigt die Hochregulation der Synthese des M30-Transkripts durch fokale cerebrale Ischämie (M30, Maus). Mit Hilfe des LightCycler Systems wurde mit quantitativer PCR die M30-Transkriptmenge nach einer fokalen cerebralen Ischämie bestimmt. Es zeigt sich
- 30 eine schnelle Hochregulation von M30 RNA um den Faktor 2 zwei Stunden nach einem Ischämieereignis. Die relativen Werte sind normalisiert für Cyclophilin. (m30 expression after 90 min ischemia 2 h reperfusion = Hochregulation der M30-Transkription nach 90

minütiger Ischämie gefolgt von 2 h Reperfusion; m30 expression after 90 min ischemia 6 h reperfusion = Hochregulation der M30-Transkription nach 90 minütiger Ischämie gefolgt von 6 h Reperfusion; m30 expression after 90 min ischemia 24 h reperfusion = Hochregulation der M30-Transkription nach 90 minütiger Ischämie gefolgt von 24 h Reperfusion; expression normalized to cyclophilin = Die Transkriptmenge wurde auf das Cyclophilin-Transkript bezogen) **Fig. 7** zeigt molekulare Funktionen von M30 im IL-1 System. Bestandteile des IL-1 Rezeptor Signalwegs. Mögliche Wirkorte von M30 sind als Pfeile angedeutet. **Fig. 8** zeigt die Sequenzidentitäten, die humanen Vertreter der M30-Genfamilie untereinander. M32 und M33 sind sehr stark verwandt, M31 divergiert am stärksten. (hm30\_D = M30, D; hm31, hm33, hm32 (frag) = M31, M33, M32 (frag) des Menschen) **Fig. 9** zeigt Sequenzidentitäten, die Vertreter der M30-Genfamilie aus Mensch und Ratte im Vergleich mit der Pellino-Sequenz aus Drosophila aufweisen aufweisen (oberes Dreieck der Matrize) beziehungsweise die entsprechenden Abweichungen (unteres Dreieck der Matrize). Die Homologiebeziehungen sind auch in Form eines Dendrogramms dargestellt. M30, D ist mit 55.5% Sequenzidentität am ähnlichsten, danach folgt M33 (54.8%) und dann M31, das am weitesten entfernt ist (48.3%). Es wurden das Programm Megalign (DNASTar, Lasergene, Madison, Wisc., USA) benutzt. (hm30\_D; hm31; hm33 = M30, D; M31; M33 des Menschen; rat m30 = M30 der Ratte).

**Fig. 10:** zeigt einen Westernblot von Proteinextrakten aus cos1-Zellen, die entweder unbehandelt geblieben waren (A) oder zuvor mit m30 (D) bzw. mit verschiedenen Negativkontrollen (EGFP (C); Leervektor (B)) transient transfiziert, und anschließend der Apoptose-auslösenden Substanz Staurosporin ausgesetzt bzw. nicht ausgesetzt worden waren. Ein spezifischer Antikörper für das PARP-Protein zeigt deutlich die Apoptose-induzierende Wirkung von m30 unter Streßeinfluß durch Staurosporin. EGFP alleine hat ebenfalls eine minimale Apoptose-induzierende Wirkung.

**Fig. 11:** zeigt die Position der m30-Fragmente auf Nukleotidebene, die für die in Beispiel 14 beschriebenen Kotransformationsexperimente benutzt wurden. Die Interaktionen dieser m30-Fragmente mit pelle werden in Tab. 2 beschrieben.

Im folgenden werden einige Beispiele angegeben, die die Erfindung illustrieren sollen. Dabei sind die Daten über die Hochregulation der M30-Transkription nach Kainatzugabe,

MECS oder fokaler Ischämie auf alle anderen Vertreter der M30-Genfamilie zu übertragen, deren Daten hier nicht gezeigt werden.

### Beispiel 1

#### 5 Klonierung der M30-cDNA aus Ratte (siehe unter Tabelle 1)

Nach Durchführung des Stimulationsprotokolls an Ratten mit MECS (massive electroconvulsive shock) (Worley, et al., *J Neurosci*, 13, 4776-86, (1993)) in Kombination mit Cycloheximid (Cole, et al., *J Neurochem*, 55, 1920-7, (1990)) wurde mRNA aus diesen st und aus Kontrolltieren mittels Standardverfahren gewonnen. Danach wurde das  
10 „suppression subtraction hybridization protocol“ (SSH) (Clontech Lab., Palo Alto, USA) durchgeführt. Es wurde ein ca. 300 bp langes Fragment isoliert. Damit wurde eine Bank hybridisiert, die für lange neuronale IEGs angereichert war. M30 wurde daraufhin durch „reverse northern blot“ Filterhybridisierung mit RNA aus den MECS-stimulierten Tieren als positiv identifiziert. Das Protokoll ist im Detail in Lanahan et al., 1997  
15 beschrieben (Lanahan, et al., *J Neurosci*, 17, 2876-85, (1997)).  
Insgesamt 3 unabhängige cDNA Klone von M30 (m30\_5, m30\_17, m30\_26) wurden mittels eines Transposon-Insertionsverfahrens (GPS-1, New England Biolabs, Beverly, MA; USA) sequenziert, und die Sequenzen mit dem Programm SeqMan (Lasergene, Madison, WI, USA) assembliert. Die erhaltene Sequenz des Klons m30\_26 war 2736  
20 Basenpaare lang und enthielt am 3'-Ende einen polyA-Schwanz und einen Bereich hochrepetitiver Sequenz am 5'-Ende, der sicher der 5' untranslatierten Region zuzurechnen ist, so dass davon ausgegangen werden konnte, daß dieser Klon die komplette cDNA von M30 umfaßt. Die Sequenz von Klon m30-26 ist in SEQ ID NO. 1 dargestellt und stellt den längsten der 3 sequenzierten cDNA-Sequenzen dar. Bei Position 2078 konnte ein  
25 Polymorphismus festgestellt werden: zwei der M30 Klone enthielten C an dieser Stelle, bei einem Klon fand sich A.

Von Position 585 bis Position 1841 der Ratten cDNA fand sich ein offenes Leseraster von 1256 bp, das für ein Protein mit 418 Aminosäuren und einem vorhergesagten Molekulargewicht von 46 kDa kodiert (SEQ ID NO 2). Eine Motivsuche ergab keine  
30 Signalsequenzen, keine Transmembrandomänen und ein putatives Kernlokalisierungssignal (PSMKRK). Demnach handelt es sich bei M30 wahrscheinlich um ein lösliches Protein,

wofür auch der Hydroprophobizitätsplot nach Kyte-Doolittle (*Kyte and Doolittle, J Mol Biol, 157, 105-32, (1982)*) spricht (nicht gezeigt). Das Kernlokalisationssignal ist jedoch in Homologen des Proteins in anderen Spezies (z.B. *Drosophila*, *C. elegans*) nicht erhalten. Die Signifikanz dieser Motivvorhersage ist daher noch unklar.

5 Zur Identifizierung der humanen Sequenzen der so isolierten cDNA wurde eine humane lambda-zapII Bank (Stratagene) aus Hippocampusgewebe mit einem XbaI-Fragment der Ratten M30 cDNA hybridisiert. Durch Sequenzieren mehrerer Klone fanden sich zwei im 5'-Bereich divergente cDNA Sequenzen: M30, A und M30, D (SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5).

10 Mehrere Oligonukleotidprimer wurden aus diesen Sequenzen ausgewählt. Zusätzlich wurden Bereiche der ungeordneten humanen genomischen Sequenz (s.u.), die der Ratten-cDNA im 5' Bereich homolog waren, für PCR-Primer ausgewählt:

hm30\_new\_s1 aaagcaccagtaaaatatggtg

hm30\_nn\_s2 tgggtgaatatactcatgacag

15 hm30\_nn\_s3 aaatggcgaatagaggaaggagg

hm30\_nn\_s4 tcacacactggcacctggtatg

hm30\_nn\_s5 agcctaggcaacagagcaagactc

hm30\_nn\_s6 gaggtaggagaaccacttgaacc

hm30\_nn\_s7 ttaaactgaaacgaattgttcac

20 hm30\_nn\_s8 gtttgcataatattgtgtcaag

hm30\_nn\_s9 gtaaaatatataatcattattgg

hm30\_nn\_a1 tgatctcttgaagaactgcac

hm30\_nn\_a2 gtacaagcaatatgcacagtgc

hm30\_nn\_a3 tgtcatgagtattcaaccac

25 hm30\_nn\_a4 ccgtgtcagttactacaaaatc

hm30\_nn\_a5 agacagagtcttgcctgttgc

hm30\_nn\_a6 gaaaaagttaatagcaaaaattag

hm30\_nn\_a7 tgatgagtc aaatcctgcagc.

(Die Sequenzen sind als SEQ ID NO 27-42 aufgeführt)

30 Eine Vielzahl von PCR-Reaktionen mit verschiedenen Oligonukleotid-Kombinationen wurden mit cDNA aus humanem Hirngewebe durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden direkt sequenziert, jeweils aus verschiedenen unabhängigen Reaktionen. Eine

Zusammenfügung der o.a. humanen cDNA-Sequenzen und der Sequenzen der PCR-Produkte ergab, dass mindestens 4 im 5'-Bereich divergente humane M30-mRNA-Sequenzen vorkommen: M30, A bis M30, D. Dabei ist die cDNA M30, C der Ratten cDNA von M30 (SEQ ID NO 1) homolog. Offensichtlich unterliegt das M30-Gen im Menschen Regulationsvorgängen über differentielles Spleißen und/ oder der Benutzung alternativer Promotoren.

Möglicherweise ist die differentielle Regulation der M30 Genexpression von definierten physiologischen oder pathophysiologischen Situationen abhängig, z.B. Krampfanfällen, da in diesen die Ratten cDNA identifiziert wurde. Bislang wurde allerdings nur eine Isoform bei der Ratte gefunden. Vorläufige Daten aus einem Cosmid mit der genomischen Maussequenz sprechen allerdings für eine starke Konservierung der Exon-Intron Struktur und der Intronlängen, was für das Vorkommen mehrerer Isoformen auch bei Maus und Ratte sprechen könnte.

#### Proteinsequenz beim Menschen

Die abgeleitete Proteinsequenz ergab bei den humanen cDNA-Sequenzen M30, A und M30, B ein um die Sequenz „MFS PDQ ENH PSK APV KYG ELI VLG YNG SLP NGD RGR RKS RFA LFK RPK ANG VKP STV HIA CTP QAA KAI SNK DQH SIS YTL SRA QTV VVE YTH DSN TD“ im Aminoterminalbereich trunkiertes Protein, das im übrigen Bereich jedoch identische Sequenzen zu der M30 Rattenproteinsequenz aufweist. Einzige Ausnahme ist ein Aminosäureaustausch an Pos. 195 der Rattensequenz (D (Ratte) → N (Mensch)).

Für die Sequenz von cDNA M30, C und M30, D des Menschen (SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 9) ergibt sich ein der Ratte entsprechendes Protein beim Menschen, mit der angegebenen Abweichung einer Aminosäure.

#### **Beispiel 2**

##### Evolutionäre Konservierung

Eine Datenbanksuche (BLAST 2 (Altschul, et al., *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402, (1997))) der EMBL, nrdb und swissprot-Datenbanken erbrachte Verwandte dieses Proteins in *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Halocynthia roretzi*, und *Onchocercus volvulus*. Ein Alignment der Proteine zeigt Fig. 2. Insgesamt findet sich eine ungewöhnlich

hohe Konservierung über alle Proteinbereiche, was auf eine wichtige funktionelle Aufgabe des Proteins schließen läßt.

### Beispiel 3

#### 5 Genomische Organisation von M30 beim Menschen

Eine Datenbanksuche mit der humanen Sequenz (BLAST2) ergab eine starke Homologie mit einer neuen ungeordneten genomischen Sequenz des humanen Genomprojektes in der emblnew Datenbank (*accession number* AC012368; *date* 26-OCT-1999 (Rel. 61, Created); 02-NOV-1999 (Rel. 61, Last updated, Version 2); *description*: Homo sapiens  
10 chromosome 2 clone NH0547M24 map unknown, WORKING DRAFT SEQUENCE, in unordered pieces.)

Die ungeordneten Contigs von Chromosom 2 enthalten alle Sequenzen, die sich in der humanen cDNA fanden, so dass sich die wahrscheinliche Exon-Intron Struktur bestimmen ließ, nachdem drei der contigs, die in falscher Orientierung zueinander lagen, rearrangiert  
15 wurden.

Es finden sich mehrere alternativ gespleißte Exons, so dass mehrere Kombinationsmöglichkeiten des Transkripts entsteht (Fig. 1). Vier dieser Kombinationsmöglichkeiten (Spleißvarianten) wurden in humaner cDNA gefunden (M30, A; M30, B; M30, C; M30, D).

20 Unter Umständen werden auch alternative Promotoren für die Entstehung der unterschiedlichen Varianten benutzt.

Vermutlich haben die differentiellen Splicingvorgänge und gegebenenfalls die Benutzung eines zweiten und dritten Promotors regulatorische und modifizierende Wirkung für die Proteinfunktion. Durch Benutzung von Exon 3 a und b entsteht ein in-frame Stopcodon,  
25 das das humane Protein im Aminoterminus trunziert (M30, B). Ebenso sind in Exon 2a zwei in-frame Stopcodons (ca. 90 bp 5' von der donor-Splice site, so dass hier ebenfalls nur ein trunziertes Protein entstehen kann. Wir vermuten, dass die unterschiedlichen Varianten beim Menschen, die in unterschiedlichen Proteinen resultieren, differentiell reguliert sind, und dass dies eine besondere Bedeutung bei zellulären Signalvorgängen  
30 spielt.

### Chromosomale Lokalisation von M30 beim Menschen

Chromosom 2 enthält einige Krankheitsloci, die u.U. für M30 interessant sind, selbstverständlich benötigt man zunächst eine subchromosomale Lokalisation. Unter diesen sind z.B. einen Suszeptibilitätsloкус für M. Parkinson (*Gasser, et al., Nat Genet, 18, 262-5, (1998)*), eine Krankheit die durch Neuronenschädigung und -tod gekennzeichnet ist. Ebenfalls interessant ist eine Kopplung von Multipler Sklerose, einer klassischen neuroimmunologischen Erkrankung, zu Chromosom 2 (*Ebers, et al., Nat Genet, 13, 472-6, (1996)*), Interessanterweise finden sich alle Gene für Interleukin 1 Liganden und Rezeptoren auf Chromosom 2, der sog. Il-1 Cluster (ILRN 2q14; IL-1beta 2q14, IL-1alpha 2q14; IL-1 receptor 2q12). Auf Chromosom 2 ist ein Suszeptibilitätslocus für Asthma-assoziierte Phänotypen (*Cookson, Nature, 402, B5-11, (1999, Wjst, et al., Genomics, 58, 1-8, (1999, Hizawa, et al., J Allergy Clin Immunol, 102, 436-42, (1998, Nat Genet, 15, 389-92, (1997))*). Dies erscheint besonders interessant im Hinblick auf die starke Expression von M30 in der Lunge. Ebenso liegt ein Suszeptibilitätslocus für rheumatoide Arthritis auf Chromosom 2 (*Hardwick, et al., J Rheumatol, 24, 197-8, (1997)*). Es ist möglich, dass Mutationen im M30 Gen für einen oder mehrerer dieser Phänotypen verantwortlich sind.

### **Beispiel 4**

#### Gewebeexpression von M30 bei der Ratte

Eine Sonde aus der M30 cDNA (aus Klon m30-17) wurde benutzt, um einen Northern-Blot mit verschiedenen Geweben der Ratte zu hybridisieren (Fig. 3). Es zeigt sich eine ubiquitäre Präsenz der spezifischen M30-Bande, die von der Grösse mit der cDNA-Länge von Klon m30-26 übereinstimmt (ca. 2.8 kb). Die Normalisierung der aufgetragenen RNA-Mengen mit einer Sonde für das ribosomale Protein S26 zeigt, dass die Expression in der Lunge am stärksten ist; die Abundanzunterschiede in den übrigen untersuchten Geweben (Hirn, Leber, Herz, Niere, Skelettmuskel, Dünndarm, Hoden) sind jedoch nicht besonders stark.

## Beispiel 5

### Regulation von M30 durch Kainat

Gesamt-RNA wurde aus Hippokampusgewebe von Ratten gewonnen, die mit Phosphatpuffer (PBS), Kainat oder Pentylentetrazol (PTZ) intra-peritoneal behandelt wurden. Die Gewebesentnahme geschah nach unterschiedlichen Zeiten nach Gabe der jeweiligen Substanz. Kainat (10 mg/kg Körpergewicht i.p.) und PTZ (50 mg/kg Körpergewicht i.p.) in den verabreichten Dosen lösen Krampfanfälle aus.

Auf einem Northernblot von diesen Geweben (Fig. 4) zeigt sich eine spezifische Hochregulation um den Faktor 3 kurze Zeit (1.5 h) nach einem Kainat-induzierten Krampfanfall. Nach längerer Zeit (24 h) finden sich keine erhöhte Expression mehr.

Dieses Experiment bestätigt die Auffassung von m30 als einem immediate early gene, das durch neuronale Excitation reguliert werden kann.

Durch in-situ-Hybridisierung mit der Ratten M30 cDNA (rm30) (benutzt wurde ein Fragment, dem die 5'utr fehlt, da diese aufgrund repetitiver Sequenzen eine unspezifische Hybridisierung auch mit der sense-Probe ergab) konnte die Hochregulation durch Kainat in der hippocampalen Region gezeigt werden (Fig. 5). Im wesentlichen wurde die Digoxigenin-labeling Methode (Fa. Roche Diagnostics) mit Modifikationen nach Kuner et al. (Kuner, et al., *Science*, 283, 74-7, (1999)) und Rossner et al. (Rossner, et al., *Mol Cell Neurosci*, 10, 460-75, (1997)) benutzt. Sense und antisense RNA-Transkripte wurden mit T7 und T3 RNA Polymerasen unter Inkorporation von Digoxigenin-gekoppeltem UTP (Fa. Roche-Diagnostics) hergestellt. cRNA Proben wurden mit NaOH hydrolysiert zu einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 200-500 bp. 15 µm Gehirnschnitte wurden mit einem Kryostat bei -20° geschnitten, auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgezogen, in 4% Paraformaldehyd in PBS (pH 7.4) fixiert.

Die Fig. 5 zeigt eine Hochregulation von M30 Transkript in Neuronen des Gyrus dentatus, der CA1 und CA4 Region. Neurone der CA1-Region sind besonders anfällig für verzögerten Neuronentod (Apoptose) nach einer Schädigung (z.B. (Hara, et al., *Stroke*, 31, 236-8, (2000))), zu einem geringeren Grad ebenfalls Neurone der CA4-Region. Der Gyrus dentatus scheint dagegen eher von einer nekrotischen Schädigung nach Ischämie betroffen (Martin, et al., *J Cereb Blood Flow Metab*, 20, 153-67, (2000)). Für Kainat sind besonders vulnerable Zellpopulationen CA1 und CA3; der Gyrus dentatus erscheint dagegen



weitgehend resistent, z.B. (Becker, et al., *Brain Res Mol Brain Res*, 67, 172-6, (1999)). Der Gyrus dentatus wird mit Neuronenneubildung nach pathologischen Stimuli in Verbindung gebracht (Takagi, et al., *Brain Res*, 831, 283-7, (1999)) (Parent, et al., *J Neurosci*, 17, 3727-38, (1997)).

- 5 Diese in-situ Lokalisierung erhärtet einen Zusammenhang von M30 mit neuronalem Zelltod, Neurogenese und Plastizität.

## Beispiel 6

### Regulation von M30 durch fokale cerebrale Ischämie

- 10 Das Tiermodell der fokalen cerebralen Ischämie stellt ein valides Modell für den humanen ischämischen Schlaganfall dar. Wir benutzten zur Herbeiführung der fokalen cerebralen Ischämie das sog. Fadenmodell, bei dem ein beschichteter Nylonfaden durch die A. carotis interna an den Abgang der A. cerebri media vorgeschoben wird und einen ischämischen Schlaganfall induziert (Clark, et al., *Neurol. Res.*, 19, 641-648, (1997)). Die
- 15 Regulation der Genexpression spielt bei der cerebralen Ischämie eine entscheidende Rolle für den Ablauf und das Ausmass des Neuronenschadens (Koistinaho and Hokfelt, *Neuroreport*, 8, i-viii, (1997, Schneider, et al., *Nat Med*, 5, 554-9, (1999)). Insbesondere immediate early genes spielen hier eine Rolle (Atkins, et al., *Stroke*, 27, 1682-1687, (1996)), wie z.B. cox-2, (Nogawa, et al., *J. Neurosci.*, 17, 2746-2755, (1997)), das in
- 20 einem ähnlichen screening-Verfahren kloniert wurde wie M30. (Yamagata, et al., *Neuron*, 11, 371-86, (1993)).

Wir untersuchten die M30 Expression nach einer fokalen cerebralen Ischämie in zwei Zeitverläufen: Zum einen in einer transienten Ischämie nach kurzer Reperusionszeit (90 min Ischämie, 2 h Reperfusion), und zum anderen in einer permanenten Ischämie von 24 h.

- 25 RNA wurde aus den beiden Hemisphärenhälften von 3-4 Gehirnen ohne Hirnstamm und Kleinhirn gewonnen. Mit Hilfe des LightCycler™ Systems (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Der cDNA Gehalt der Proben wurde auf die Expression von Cyclophilin normiert. Benutzte Primer zur Amplifikation von Cyclophilin waren:

- 30 cyc5 accccaccgtgttcttcgac  
acyc300 catttgccatggacaagatg

und zur Amplifikation von Maus M30

mouse\_m30\_s3 tactcagcagacgaacactg

mouse\_m30\_a4 gtttttgatgaatcaaacc.

(SEQ ID NO 43 bis SEQ ID NO 46)

- 5 Tatsächlich zeigt sich eine Hochregulation um den Faktor 2 von M30-RNA auf der ischämischen (linken) Hirnhälfte 2h nach dem ischämischen Ereignis (Fig. 5). Nach 24 h (in einem permanenten Modell) hingegen konnte kein Unterschied mehr festgestellt werden. Dies unterstreicht die Interpretation von M30 als „immediate early Gen“.

- Insbesondere beim Schlaganfall ist die pathophysiologische Bedeutung des IL-1 Pathways sehr gut belegt (Relton and Rothwell, *Brain Res Bull*, 29, 243-6, (1992, Betz, et al., *J Cereb Blood Flow Metab*, 15, 547-51, (1995, Loddick, et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 234, 211-5, (1997, Betz, et al., *Keio J Med*, 45, 230-7; discussion 238, (1996)). Der nachgeschaltete Transkriptionsfaktor NF-kappaB scheint eine zentrale Rolle für den Zelluntergang zu spielen (Schneider, et al., *Nat Med*, 5, 554-9, (1999, Clemens, et al., 15 *Stroke*, 28, 1073-1081, (1997, Lipton, *Nature Med.*, 3, 20-22, (1997)).

- Folglich sollte M30 eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Schlaganfalls spielen. Die Hochregulation von M30 könnte hierbei entweder eine protektive Rolle spielen, z.B. in der Desensibilisierung des IL-1 Rezeptorsystems in einer Situation des IL-1 Überangebots, wie bei der cerebralen Ischämie, oder eine zellschädigende Wirkung über eine Verstärkung der 20 Aktivierung nachgeschalteter Systeme (z.B. NF-kappaB, JNK, p38) ausüben.

### Beispiel 7:

#### Nachweis einer proapoptotischen Wirkung von m30 in Säugetierzellen

- Um einen Einfluss von Mitgliedern der m30-Genfamilie auf Zelltodvorgänge in Säugetierzellen zu nachzuweisen, wurden cos-1 Zellen mit Expressionsvektoren, in denen 25 die cDNA für m30 funktionell mit einem heterologen Promotor verknüpft ist, transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen einer Stimulation mit einer Apoptose-auslösenden Substanz (Staurosporin) ausgesetzt. Das Ausmaß des darauf erfolgenden apoptotischen Zelltods wurde durch die sogenannte PARP-Spaltung, einem Indikator für apoptotischen Zelltod, mittels eines spezifischen Antikörpers ermittelt.

PARP ist ein Substrat der todesauslösenden Caspasen (Caspase-3), und das Ausmaß der Spaltung von PARP durch die Caspase-3 wird als spezifischer Indikator für Endschritte der Apoptose in Zellen angesehen (Konopleva M, Zhao S, Xie Z, Segall H, Younes A, Claxton DF, Estrov Z, Kornblau SM, Andreeff M (1999) Apoptosis. Molecules and mechanisms. Adv Exp Med Biol 457:217-236.; Duriez PJ, Shah GM (1997) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. Biochem Cell Biol 75:337-349).

Der kodierende Bereich der m30 cDNA wurde in den Expressionsvektor *pCMVtag2* der Firma *Stratagene* kloniert. Dabei wurde der N-Terminus der m30 cDNA "im Leseraster" mit einer Flag-Epitop-Markierung versehen. Hierzu wurde mittels PCR mit den Primern m30\_Es\_s1 (GATC GAATTC TTT TCT CCT GAT CAA GAA; Seq ID NO 19) und m30\_Sa\_a1 (GATC GTCGAC GTC TAG AGG TCC TTG GAA; Seq ID NO 24) auf das Plasmid *m30-26* ein Amplicon generiert, das mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Sall geschnitten wurde, und in den *pCMVtag2*-Vektor ligiert wurde. Mittels anschließender Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, daß die Sequenz der Flag-markierten m30 cDNA keinerlei unerwünschte Mutationen enthält.

Zur Transfektion von Säuger-Zelllinien können mehrere Techniken verwendet werden, z.B.:

#### a) Calcium-Phosphat-Transfektion von COS-1 Zellen

In Petrischalen kultivierte COS-Zellen wurden zweimal mit dem Puffer TBS gewaschen. Anschließend wurden je 3ml einer Mischung von 500µl DEAE-Dextran-beads (5mg/ml H<sub>2</sub>O, über Nacht gequollen), 1,5ml 2xTBS, 50µl Plasmid-DNA [0,2µg/µl] und 950µl H<sub>2</sub>O auf die Zellen gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation im Brutschrank wurden 5ml Chloroquinelösung (50ml COS-Zellmedium (=DMEM + 10%FCS + 1%Penicilin/Streptomycin) + 500µl 10mM Chloroquine) zugegeben und die Zellen wurden weitere zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen abgesaugt. Die Zellen wurden mit 20%igem Glycerin in COS-Zellmedium versetzt und dann vier Minuten inkubiert. Die Zellrasen wurden zweimal mit je 5ml TBS gewaschen und anschließend mit 10ml COS-1 Medium im Brutschrank inkubiert.

b) Elektroporation von COS-1 Zellen

COS-1 Zellen wurden mit Trypsin aus den Kulturschalen gelöst und abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 300µl Elektroporationspuffer resuspendiert und anschließend mit 7,5µl 1M MgSO<sub>4</sub>-Lösung versetzt. Je 300µl dieser Zellsuspension wurden mit 1-5 µg Plasmid-DNA in 4mm-Elektroporationsküvetten (PEQLAB) überführt. Die Elektroporation erfolgte mittels eines Gene-Pulser II (BIORAD) bei 500µF/230V. Die Zellen wurden anschließend mit 5ml COS-1 Medium im Brutschrank inkubiert.

c) Elektroporation von PC12-Zellen

Die PC-12 Zellen wurden mit Trypsin aus den Kulturschalen gelöst und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Je Ansatz wurden 3,5 Millionen Zellen in 300µl PC-12-Zellmedium (=DMEM + 10% Horse Serum+ 5%FCS) resuspendiert und mit 10,5 µg Plasmid-DNA in 4mm-Elektroporationsküvetten (PEQLAB) überführt. Die Elektroporation erfolgte mittels eines Gene-Pulser II (BIORAD) bei 950µF/280kV. Die Zellen wurden anschließend mit 5ml PC-12 Medium im Brutschrank inkubiert.

Zum Nachweis der Spaltung von PARP wurden COS- und PC12-Zellen transient mit dem Expressionsvektor *pCMVtag2*, in den die cDNA für m30 kloniert worden war, transfiziert. Am 2. Tag nach der Transfektion wurden die Zellen fünf Stunden mit 0 oder 0,2µM Staurosporin (CALBIOCHEM) in Medium gestresst. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und die übrigen Zellen wurden mittels Abschaben von den Platten gelöst und in gekühltem (4°C) PBS mit Protease-Inhibitoren (Pepstatin [2,5mg/ml] und Aprotinin, beides SIGMA; 1:1000) aufgenommen. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (4min, 4000rpm) und nochmals mit 1ml PBS mit Protease-Inhibitoren gewaschen. Die erhaltenen Pellets wurden anschließend in einem Volumen 2% SDS aufgenommen und je 5µl Benzonaselösung (40µl 100mM MgCl<sub>2</sub> + 9µl Benzonase, BOEHRINGER) wurden hinzugegeben. Je 1µl jeder Probe wurde für eine Proteinbestimmung (BCA-Test, PIERCE, Durchführung nach Herstellerangaben) eingesetzt. Für anschließende

Westernblot-Analysen wurden je 100 µg Protein eingesetzt und diese mit 5µl 4x Ladepuffer (Laemmli) versetzt. Die Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend mittels 8%igen denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen bei 20mA pro Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels einer Semi-Dry-Blottingkammer (BIOMETRA) in  
5 Transferpuffer (25mM Tris-HCl, 150 mM Glyzin, 10% Methanol, pH 8,3) für 60 min auf Nitrozellulosemembranen (Protan BA79, SCHLEICHER & SCHUELL) transferiert (ca. 150mA/Gel). Die Membranen wurden zunächst mit 5% Magermilchpulver (frema Reform, NEUFORM) in PBS/0,02% Tween20 geblockt, dann 3x 5min mit PBS/0,02% Tween20 gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Erstantikörper inkubiert (COS-  
10 Zellen: anti-cleaved-PARP-Antikörper, PROMEGA, 1:800; PC12-Zellen: anti-cleaved-PARP-Antikörper (Ratte), CELL SIGNAL, 1:1000). Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween 20 wurden die Blots mit dem Zweitantikörper (anti-Kaninchen-Antikörper HRP-gekoppelt, Dianova, 1:5000) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem SuperSignal Chemiluminiszenzsystem von PIERCE nach  
15 Herstellerangaben auf Hyperfilm-ECL (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

In den COS-1 Zellen, die mit der cDNA für m30 transfiziert wurden, ließ sich - verglichen mit Zellen, die nur mit dem Leervektor transfiziert waren - nach Stimulation mit 0,2µM Staurosporin (CALBIOCHEM) eine vermehrte Spaltung von PARP nachweisen. (siehe Fig. 10). Dies zeigt, daß die Expression von m30 unter Stressbedingungen für Zellen eine  
20 zelltodfördernde Wirkung hat.

Die Proteine, die der m30-Genfamilie angehören, werden daher nicht nur spezifisch unter Streßbedingungen, wie sie z.B. beim Schlaganfall auftreten, exprimiert, sondern sind daher mit großer Wahrscheinlichkeit auch funktionell an dem Fortschreiten des neuronalen Zelltods unter diesen Streßbedingungen beteiligt.

25 Diese ersten experimentellen Hinweise, die für die Zelltod-fördernde Wirkung der Proteine aus der m30-Familie sprechen, verdeutlichen auch erstmalig die Bedeutung der Proteine der m30-Familie als potentielle pharmakologische Targets. So könnte z.B. die Verwendung von funktionalen Inhibitoren der m30-Proteine, die die Zelltod-fördernde Wirkung dieser Proteine hemmen, bei der Behandlung von neurodegenerativen  
30 Erkrankungen eine tragende Rolle spielen.

## Beispiel 8

### Verwandte von M30 im Säugetier: m31

Viele wichtige Proteine in Säugetierzellen liegen in mehreren ähnlichen Formen vor, und werden durch sog. Genfamilien kodiert. Diese sind durch Duplikation und andere genomische Rearrangements im Laufe der Evolution entstanden. Der Vorteil dieses Prozesses ist zum einen Redundanz besonders wichtiger Funktionen, zum anderen Diversifizierung existierender basaler Funktionen.

Die Hybridisierung einer Ratten cDNA-Bank aus Hippocampus (s.o.) erbrachte keine zusätzlichen ähnlichen cDNA-Klone. Eine alternative Methode zum Auffinden von Verwandten ist ein PCR-Ansatz mit degenerierten Primern (*Rossner, et al., Mol Cell Neurosci, 10, 460-75, (1997, Lai and Lemke, Neuron, 6, 691-704, (1991))*). Für M30 wurden folgende evolutionär konservierte Peptidbereiche zum Primerdesign benutzt:

NCGHVG und CPFAHQ. Daraus ergeben sich folgende degenerierte Oligonukleotidsequenzen:

M30ex6deg-s: AAYTGYGGNCAYGTNCANGG; Seq ID NO 47

M30ex6deg-as: TGRTGNGCRCARAANGGRCA; Seq ID NO 48

(SEQ ID NO 47 bis SEQ ID NO 48)

Mit diesen Primern wurden PCR-Ansätze für Maus- und Ratten cDNA (Gesamthirn) und für genomische Maus-DNA unter Benutzung eines *Touchdown*-Protokolls durchgeführt. Mehrere erhaltene Banden wurden subkloniert (in den Vektor pcDNA 2.1 TOPO, Fa. Invitrogen) und sequenziert. Drei identische Klone mit einer neuen homologen Sequenz wurden aus der genomischen Maus-DNA erhalten (Länge 275 bp):

TAAYTGTGGTCATGTTCA YGGCTATCACGGCTGGGGCTGCCGGAGGGAACAAG  
GCCCCAGGAGCGAGAGTGTCCTCTCTGCCGCCTTG TGGGACCCTATGTGCCC  
CTGTGGCTCGGTCAGGAGGCCGGTCTCTGCCTGGACCCTGGGCCACCCAGCCA  
CGCTTTTGCACCCTGTGGCCACGTCTGTTCTGAGAAGACTGCCCGCTACTGGGC

TCAGACACCGCTGCCGCACGGCACCCATGCTTTCCACGCTGCCTGYCCGTTCTG  
CGCHCACC

Im Leseraster 2 kodiert diese Sequenz für ein Homologes von M30, m31:

5

...NCGHVHGYHGWGCRREQGPQERECPLCRLVGPYVPLWLGQEAGLCLDPGPPSH  
AFAPCGHVCSEKTARYWAQTPLPHGTHAFHAACPFAH...

Folglich existiert eine M30-Genfamilie.

10

15

### Beispiel 9

Klonierung der murinen und humanen M31-cDNA (SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13)

Herstellung muriner und humaner cDNA-Bibliotheken

- 20 Mit dem cDNA-Synthese Kit der Fa. Stratagene wurde ausgehend von 2 µg humaner  
fötaler Gehirn-mRNA (Fa. Clontech) und von 5 µg mRNA aus adultem Mausgehirn  
entsprechende cDNA-Bibliotheken hergestellt. Dabei wurde im wesentlichen entsprechend  
der Angaben des Herstellers verfahren. Zur Synthese der Erststrang cDNA wurde in  
Abänderung zu den Herstellerangaben ein Oligonukleotid mit z.T. zufälliger Sequenz  
25 (Sequenz 5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGOTCGAGNNNNNN-3'; Seq ID NO 49)  
verwendet. Die klonierungskompatiblen (EcoRI/XhoI) doppelsträngigen cDNA-Fragmente  
wurden größenselektioniert (nach Herstellerangaben/ Fa. Stratagene) und in den  
Plasmidvektor pBluescript SKII (Stratagene) ligiert. Die Ligation wurde durch  
Elektroporation in E.coli (DH10B, Gibco) transformiert und auf LB-Ampizillin Agar-  
30 Platten amplifiziert. Die Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Lyse und  
Ionenaustauscher-Chromatographie isoliert (QIAfilter-Kit, Fa. Qiagen).

Die Komplexität an Einzelklonen betrug für die murine Gehirn cDNA-Bank 7 Millionen und für die fetale humane Gehirn cDNA-Bank 4 Millionen. Von jeder cDNA-Bank wurden zufallsmäßig 24 Einzelklone nach Insertgrößen analysiert, die eine Größenverteilung von 800 bp bis zu 4.5 kB zeigten, die durchschnittliche Länge der cDNA-Inserts betrug für die Mausbank ca. 1.5 kB für die humane Bank ca. 1.2 kB.

#### Isolierung von murinen und humanen cDNA-Plasmidklonen für m31

Die Isolierung muriner und humaner cDNA-Klone für m31 wurde unter Verwendung von m31-spezifischen biotin-markierten Oligonukleotiden durchgeführt (modifiziertes Protokoll nach Shepard und Rae (NAR 1997 25 no15 p3183-3185)).

Verwendete Oligonukleotide zur Isolierung der murinen cDNAs:

mM31-bio25

CGGTCAGGAGGCCGGTCTCTGCCTG; Seq ID NO 50

mM31-5'40

CTCTCTGCCGCCTTGTGGGACCCTATGTGCCCTGTGGCT; Seq ID NO 51

mM31-3'40

GACCCTGGGCCACCCAGCCACGCTTTTGCACCCTGTGGCC; Seq ID NO 52

Verwendete Oligonukleotide zur Isolierung der humanen cDNAs:

Biotin Pull

5'M31hum5'40

ACCTGCCCACCCAGGTCCCCACCTCCTGCAGCCCAGAGGG; Seq ID NO 53

5'M31hum-bio25 (EST NEST search ok)

AGCTCTGCATGTGGGACACTCCCTG; Seq ID NO 54

5'M31hum3'40

CTGGCACAGCACACCAGATGGACATGTTGGATGGGCTGTG; Seq ID NO 55

(SEQ ID NO 50 bis SEQ ID NO 55)



Das verwendete Verfahren beruht auf einer Hybridisierung biotin-markierter humaner oder muriner 9B5-Oligonukleotide mit 5 µg alkalisch denaturierter Plasmid-DNA. Zusätzlich werden unmittelbar 5' und 3' gelegene 40mer-Oligonukleotide hybridisiert. Dadurch wurden einzelne Plasmidmoleküle spezifisch biotin markiert, die entweder murine oder humane cDNAs enthielten. Die Hybridisierungsbedingungen wurden von Sheperd und Rae übernommen ((NAR 1997 25 no15 p3183-3185)).

Die Anreicherung der biotin-markierten Plasmidmoleküle wurde mit magnetischen Streptavidin-gekoppelten Beads durchgeführt (entsprechend den Herstellerangaben, Fa. Dynal). Nach mehrfachen Waschschritten wurden die m31-angereicherten Plasmide thermisch von den magnetischen Beads gelöst (80°C, 2min) und in E.coli (DH10B, Gibco) elektrotransformiert. Transformandenkolonien wurden vereinigt und Plasmid-DNA isoliert (QIAprep Mini Spin-Columns, Qiagen). M31-cDNA enthaltende Plasmide wurden wiederholt durch Hybridisierung mit den entsprechenden Oligonukleotiden angereichert. Von jeweils 36 der Bakterien-Kolonien der Zweitrunden-Transformanden wurde Plasmid-DNA isoliert und mit cDNA-Insert-flankierenden Primern (T3 und T7 Primer, pBluescript SK II, Stratagene) sequenziert. Die cDNA Inserts von m31 mRNA-Sequenz enthaltenden Plasmiden wurden mit spezifischen Primern vollständig sequenziert.

Die abgeleiteten murinen mRNA-Sequenzen mm31 wurden aus insgesamt 3 überlappenden cDNA-Klonen erstellt, die entsprechenden humanen mRNA Sequenzen (hm31) aus fünf unabhängigen cDNA-Klonen.

#### Charakteristika der Nukleotidsequenz von M31

Eine Datenbanksuche mit der humanen M31 Nukleotidsequenz mit dem Programm BLASTN gegen die EMBL EST Datenbank ergab ESTs in folgenden Geweben: Ovarialtumor, insbesondere (10), Niere: Wilmstumor (metastasierend zu Hirn), Fetus gesamt 9 Wochen, Placenta (vollentwickelt) (2), Mamma, normales Epithel, Cerebellum, hNT-Neuronen, Frontaler Cortex. Dies lässt darauf schliessen, dass m31 vor allem in Ovarien und Gehirn exprimiert ist. Die erstaunlich hohe Frequenz des Vorkommens in Ovarialtumoren lässt auf eine starke Hochregulation in diesen Tumoren schliessen, und

impliziert eine wichtige diagnostische/therapeutische Bedeutung von m31 für diese Tumorgruppe.

#### Charakteristika der Aminosäuresequenz von M31

5 Es ergibt sich für hm31 ein offenes Leseraster von 445 Aminosäuren, einem Molekulargewicht von 48 kD, und einem isoelektrischen Punkt von pH 7,95.

Eine Analyse der Proteinsequenz von hm31 mit dem Programm PSORT II ergibt keine Hinweise auf intrazelluläre Lokalisation, insbesondere keine Kernlokalisationssequenz.

10 Eine Analyse mit dem Programm Tmpred zur Vorhersage von Transmembrandomänen ergibt eine mögliche TM-Region am extremen Carboxyterminus (Pos. 414 bis 436), mit dem N-Terminus intrazellulär. Dies ist im biologischen Kontext eher eine unwahrscheinliche Konstellation.

M31 ist sehr homolog zu M30 (siehe Fig. 8, Alignment von M30 und m31 aus Ratte oder Maus und Mensch). Am N-Terminus unterscheidet es sich durch Insertion einer  
15 Peptidsequenz von M30. Homologe Proteine unterscheiden sich häufig am stärksten am N-Terminus.

Eine Datenbanksuche mit der humanen m31 Proteinsequenz mit dem Programm BLASTP gegen die nrdb Datenbank ergab als einzige signifikante Hits #O77237 (Drosophila Pellino) und das bekannte cosmid F25B4 aus *c. elegans* (#Q22967).

20 Eine Datenbanksuche mit der humanen M31 Proteinsequenz mit dem Programm TBLASTN gegen die EMBL EST Datenbank ergab keine wesentlichen neuen Sequenzen im Vergleich mit M30. Es taucht ein neues Homologes in *Gallus gallus* (AJ393800) und *Anopheles gambiae* (AGA280402) auf.

#### **Beispiel 10**

##### 25 Durchführung eines yeast two-hybrid-Screens mit M30 der Ratte

Die cDNA-Sequenz von M30 wurde benutzt, um einen yeast-two-hybrid Screen durchzuführen. Dieser dient dazu, solche Proteine zu detektieren, die mit dem fraglichen Protein, dem sogenannten *bait protein*, interagieren (Fields et al.(1998), Nature 340, S. 245

30 - 246). Ein Screen mit dem carboxyterminalen Drittel von M30 (Rattensequenz) als *bait protein* wurde mit Hilfe des Matchmaker-Systems der Fa. Clontech durchgeführt. Dazu wurde mittels PCR ein M30-Fragment aus dem Rattenklon *m30-17* amplifiziert (Fragment

3; Primer: m30ES-s3 GATC GAATTC TTC CCC AGC ATG AAG AGG und Primer m30Sa a1 GATC GTCGAC GTC TAG AGG TCC TTG GAA) und in den Vektor *pGBT10* („Baitvektor“) über die Klonierungsstellen *EcoRI* und *Sall* einkloniert. Der Screen wurde mit der „pretransformed human brain library“ im dem Vektor *pACT2* („Prey-Vektor“) durchgeführt (cat# HY4004AH). Zur Transformation des Bait-Konstruktes wurde das  *mating*-Verfahren nach den Angaben des Herstellers benutzt. Positive Klone wurden auf Histidin-defizienten Agarplatten zur Detektion der Reportergen-Expression (Expression des *His3*-Gens) selektioniert. Diese Ergebnisse wurden anschließend durch die Durchführung einer  $\beta$ -Galactosidase-Färbung verifiziert, mit der die Expression eines zweiten Reportergens, nämlich die des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens, detektiert werden kann (nach Angaben des Herstellers).

Aus den positiven Klonen wurden nach Durchführung einer Hefe-Plasmid-Minipräparation mittels PCR die cDNAs amplifiziert, die in die Prey-Vektoren der positiven Klone einkloniert worden waren. Diese cDNAs kodierend für Proteine, die mit dem bait-Protein (hier dem m30-Protein) interagieren, wurden anschließend sequenziert und durch den Vergleich mit elektronischen Datenbanken identifiziert. Von ca. 50 sequenzierten Produkten fielen 2 identische Sequenzen auf, die Ähnlichkeit zu M30 hatten:

Dieses Protein wurde M32 (SEQ ID NO 17) genannt. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, daß M30 mit M32 interagiert, und seine Funktion möglicherweise als Heterodimer erfüllt. Eine Heterodimerisierung als Voraussetzung für eine Proteinfunktion ist in vielen Beispielen belegt und ist auch hier zu vermuten.

Die Interaktion von m30 mit m32 wurde durch Kotransformationsexperimente bestätigt, wobei m30 als bait, der carboxyterminale Teil von m32 als prey fungierte. Dabei erfolgte ein Wachstum der kotransformierten Kolonien auf Histidin-defizienten Medien, allerdings keine deutlich positive  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung, so dass von einer eher schwachen Interaktion zwischen m30 und m32 auszugehen ist.

### Beispiel 11

Klonierung von M33 (SEQ ID NO 15)

Zur full-length Klonierung des Klons M32 wurden für die PCR-Klonierungsmethode Oligonukleotide entworfen. Diese amplifizierten ein Fragment der erwarteten Größe, das sich jedoch beim Sequenzieren als eine von M32 verschiedene Sequenz herausstellte.

Diese Sequenz wurde als weiteres Homologes M33 bezeichnet.

Bei einer Blast-suche (Nukleotidsuche) der EMBL-Datenbank ergaben sich mehrere genomische ungeordnete Sequenzen, die Teile von M33 enthielten.

Durch Benutzung von Informationen zu konservierten Proteinbereichen in M30 und M31, sowie der Kenntnis der Exon-Struktur, konnte die kodierende cDNA-Sequenz voll erhalten werden.

Die benutzten genomischen Sequenzen waren dabei: AL355073, AC022462, HSC6461, CNS01DX0, AQ473307.

Die folgende Exon-Intron Struktur ergab sich hierbei:

**Exon1:**

...cggcggaggcggcggcgtcggcgggcggtcggcgccgagcggggctccAtgtttccctggccaggaggaacactg  
cgcccccaataaggagccagtgaaatacggggagctgggtgtgctcgg  
Splice e/i:  
Gtgctcgg//gtgagtcc

### Exon 2:

splice i/e  
ctctgtttctag//gtacaatggt

gtacaatggtgctttaccaatggagatagaggacggaggaaaagtagatttgccctctacaagcggcccaaggcaaa  
tggtgtcaaaccagcaccgtccatgtgatatccacgcccaggcatccaag  
splice e/i  
ggcatccaag//gtaggtgggtctgtc

- 48 -

## Exon 3:

splice i/e

tttattattag//gctatcagctg

5 gctatcagctgcaaaggtcaacacagtatactctacactttgtcaaggaatcagactgtgggtgggtgagtacacacatga  
taaggatacggatatgtttcag

splice e/i

ggatatgtttcag//gtaatatTTTTTTTTtaata

10

## Exon 4:

splice i/e

15 tttgatttacttag//gtgggcagatcaac

gtgggcagatcaacagaaagccctatcgacttcgtgtcacagacacgatttctggcagccagaacacggacgaagccca  
gatcacacagagcaccatatccaggttcgctgcaggaatcgtgtgcgacaggaatgaaccttacacagcacggatatctg  
ccgccggatttgactcttccaaaacataattcttggga

20

splice e/i

aacatatttcttggga//gtaagtactgt

25

## Exon 5:

splice i/e

tgctgtgttctctccag//gaaaaggcagcaaagtgg

30

gaaaaggcagcaaagtggaaaaaccccgacggccacatggatgggctcactactaatggcgtcctggatgcacccacg  
agggggcttcaccgaggagtccagcccgggtctggcgcgagatctctgtctgtggagatgttacaccttgcgagaaa  
ccaggtcggccagcaacgaggaaagctg

35

splice e/i

cgaggaaagctg//gtgagtgtgcttcac

40 Exon 6:

splice i/e:

aacttggttag//gtggaaagtgagaccaa

gtggaaagtgagaccaacgtcctgcaggacggctccctcattgacctgtgtggggccactctcctctggagaacagcagatgggc  
 5 ttttcatactccaactcagaagca  
 catagaagccctccggcaggagattaacgccgcccggcctcagtgtcctgtggggctcaacaccctggccttccccagca  
 tcaacaggaaagaggtggtggaggagaagcagccctgggcatatctcagttgtggccacgtgcacgggtaccacaactgg  
 ggccatcggagtgacacggaggccaacgagagggagtgccatgtgcaggactgtgggcccctatgtgcctctctggct  
 10 tggctgtgaggcaggattttatgtagacgcaggaccgccaactcatgcttccactccctgtggacacgtgtgctcggaga  
 agtctgcaaaatactggtctcagatcccggtgcctcatggaactcatgcattcacgctgcttgccttctgtgtctaca  
 cagctggttggggagcaaaactgcatcaaattaatttccaagggtccaattgactga  
 3'utr  
 cgcccttgacagccatctacgactttattaacaggttactgtgaagatttggcactaactctagattttaccttttgt  
 aatgctgtttatcagaggagggtgacaggggctggaaataagagaggggacatggtgatgaacatggcaggagtgtaa  
 15 cagataccagtggtgtgtgcatgctcaaacagcagcgtcgtcattgaagctgcttgattaaaccataatatcttgt  
 aataattggatt

Auf Proteineebene ergab sich ein Protein von 420 Aminosäuren mit einem  
 20 Molekulargewicht von 46 kD. Das Programmpaket PSORT II sagt eine cytoplasmatische  
 Lokalisation voraus, und erkennt keinerlei Signalsequenzen oder Motive. Das Programm  
 TM-pred sagt voraus, dass es sich bei M33 (Mensch) um kein Transmembranprotein  
 handelt. Die chromosomale Lokalisation von M33 ist auf Chromosom 14.

Die Proteinsequenz aus dem Carboxyterminalen Bereich (195 Aminosäuren), die von M32  
 25 bekannt ist, weist eine erstaunliche Identität von 97.9% über diesen Bereich mit M33 auf,  
 was erklärt, warum dieser Klon mit der PCR zur Auffindung von hm32 kloniert wurde.  
 Sehr wahrscheinlich interagiert auch M33 mit M30, da die Sequenzen faktisch identisch  
 sind (zumindest im Carboxyterminalen Bereich, der interagieren sollte).

Wie die hohe Ähnlichkeit von M32 und M33 bereits nahelegt, ist auch M33 in der Lage  
 30 mit M30 Heterodimere zu bilden und ist aller Voraussicht nach für dessen Funktion  
 wichtig.

## Beispiel 12

### Weitere Funktionen der Mitglieder der M30-Genfamilie

Die Datenbanksuche mit dem M30 Protein aus Ratte ergab eine Homologie zu einem  
 35 Protein aus Drosophila, *pellino* (Grosshans, et al., Mech Dev, 81, 127-38, (1999)),  
*accession number: AF091624*. In Drosophila wurde *pellino* aufgrund seiner Interaktion mit

*pelle* identifiziert (Grosshans, et al., *Mech Dev*, 81, 127-38, (1999)). *Pelle* ist ein Protein in der Signalkaskade des toll-Rezeptors, der eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung von *Drosophila* spielt (Ventralisierung) (Belvin and Anderson, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, 393-416, (1996)). Dabei aktiviert *Pelle* das NF- $\kappa$ B-Homologe *dorsal* in *Drosophila*.

Das toll-Rezeptorsystem hat sich aus einem System mit wenigen (bekannten) Komponenten zu einem komplexen Regulationssystem im Säugetier entwickelt (Belvin and Anderson, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, 393-416, (1996)). Im Säugetier gibt es mehrere toll-homologe Rezeptoren (IL-1, IL-18, TLR-1,...). Das wichtigste Rezeptorsystem ist der Interleukin-1 Rezeptor, der in vielen pathologischen Prozessen eine Rolle spielt (Auron, *Cytokine Growth Factor Rev*, 9, 221-37, (1998)). Die Aktivierung dieses Rezeptors führt ebenfalls zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, allerdings über eine Signaltransduktionskaskade mit mehreren Proteinen. Die Gruppe der Interleukin-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M) (Cao, et al., *Science*, 271, 1128-31, (1996, Muzio, et al., *Science*, 278, 1612-5, (1997, Wesche, et al., *J Biol Chem*, 274, 19403-10, (1999)) ist dabei homolog zu *pelle*, und wichtig für die optimale Funktion der Signalübertragung (Kanakaraj, et al., *J Exp Med*, 187, 2073-9, (1998, Vig, et al., *J Biol Chem*, 274, 13077-84, (1999)).

Da *pellino* im *Drosophilasystem* mit *pelle* assoziiert ist, sollten die Mitglieder der M30-Genfamilie im Säugetier eine funktionell wichtige Rolle im IL-1-Signaltransduktionskaskaden spielen. Insbesondere ist eine funktionelle Beeinflussung der Interleukin-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M) denkbar. Ebenso kann M30 auf weiter „downstream“ gelegene Ereignisse in der Signaltransduktionskaskade wirken, die eine direkte Wirkung auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B haben. Mögliche Wirkungsorte sind hierbei die NIK-Kinase oder IKK-Kinasen (Karin, *J Biol Chem*, 274, 27339-42, (1999)). Der Signaltransduktionsweg und mögliche Wirkorte von M30 sind schematisch in Fig. 6 dargestellt. Denkbar ist auch, dass M30 an einem neuen Signalweg vom IL-1 oder IL-18- Rezeptor zu MAP-Kinasen beteiligt ist (z.B. p38). Dieser Signalweg ist bisher weniger gut charakterisiert. Ebenso wird eine Aktivierung der Jun-N-terminalen Kinase (JNK) durch IL-1/ IRAK diskutiert.

Die Funktion von Mitgliedern der M30-Genfamilie in diesem Pathway könnte eine modulierende verstärkende oder abschwächende Wirkung auf die Signalübertragung

haben. Die sehr schnelle Regulation von M30-mRNA in Prozessen, in denen Interleukin-1 vermehrt exprimiert wird (Kainatgabe (Eriksson, et al., *Brain Res Mol Brain Res*, 58, 195-208, (1998), Panegyres and Hughes, *J Neurol Sci*, 154, 123-32, (1998), Yabuuchi, et al., *Brain Res Mol Brain Res*, 20, 153-61, (1993), Minami, et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 176, 593-8, (1991, Minami, et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 171, 832-7, (1990)) oder fokale cerebrale Ischämie (Buttini, et al., *Brain Res Mol Brain Res*, 23, 126-34, (1994, Zhang, et al., *Brain Res*, 784, 210-7, (1998))), unterstreicht diese Annahme. M31 ist darüber hinaus, aufgrund seines Vorkommens in Ovarialtumoren, für Diagnose und Therapie dieser Tumorart von Bedeutung.

10

#### Bedeutung von M30 für pharmakotherapeutische Ansätze

In jüngerer Zeit gewinnen Ansätze zur Inhibierung/Beeinflussung von Signaltransduktionswegen „downstream“ eines membranständigen Rezeptors in der pharmakologischen Forschung zunehmend Bedeutung. Diese Ansätze werden wahrscheinlich in Zukunft einen wichtigen Anteil in der Therapie humaner Erkrankungen haben, insbesondere bei bisher schlecht oder nicht therapierbaren Erkrankungen (Kletsas and Papavassiliou, *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 8, 737-746, (1999)). Vorteile dieser Ansätze sind, dass sie erstens Ereignisse beeinflussen können, die von mehreren Stimuli hervorgerufen werden können, und eine gemeinsame Endstrecke haben, zweitens, dass zelluläre Ereignisse zeitlich nach dem auslösenden Stimulus liegen, und deshalb länger einer Intervention zugänglich sind.

15

20

Beispiele für erfolgreiche Eingriffe in solche Signalkaskaden sind beispielsweise Inhibitoren für Caspasen (Ekert, et al., *Cell Death Differ*, 6, 1081-1086, (1999)), die Apoptoseprozesse noch längere Zeit nach einem auslösenden Stimulus blockieren können. Besondere Aufmerksamkeit hat auch der Transkriptionsfaktor NF-kappaB gefunden, sowie Prozesse, die diesen aktivieren. Beispielsweise wurde die Klonierung der I-kappaB-Kinasen mit dem Ziel verfolgt, spezifische Inhibitoren für NF-kappaB vermittelte Gentranskription zu finden. Die pharmakologische Bedeutung von NF-kappaB liegt vor allem auf den Gebieten der Immunerkrankungen, der Krebserkrankungen, und neurologischer Erkrankungen.

30



Ein wichtiges Aktivierungssystem für diesen Transkriptionsfaktor ist das Interleukin-1 System (*Baeuerle, Curr Biol, 8, R19-22, (1998)*). Eine pharmakologische Beeinflussung dieses Systems ist von potentiell grosser Bedeutung für die Therapie einer Vielzahl von Krankheiten.

- 5 Das Signalsystem Il-1/NF-kappaB kann, wie oben angeführt, an den Endpunkten, der Bindung des Liganden an den Il-1 Rezeptor beispielsweise, oder der Aktivierung von NF-kappaB selbst beeinflusst werden. Eine Vielzahl von molekularen Schritten zwischen diesen beiden Punkten sind für das Funktionieren des Systems essentiell, und bieten sich ebenfalls für eine pharmakologische Beeinflussung an. Bisher unbekannte Moleküle (wie
- 10 M30) können von essentieller Bedeutung für das Funktionieren dieses Systems sein, da sie z.B. in den gängigen Assays (z.B. Zell-Transfektionsstudien) gegenwärtig sind.

- Differentielle Transkriptionsprofilierungen gewinnen in der Pharmaforschung zur Identifizierung potentieller neuer Targets für Pharmaka in letzter Zeit grosse Bedeutung.
- 15 Transkriptionelle Regulation, d.h. Regulation der mRNA-Menge eines Gens in der Zelle, ist ein wesentlicher Schritt für die Reaktion der Zelle auf Stimuli, neben Proteinphosphorylierungen, Proteindegradation etc. M30 unterliegt offensichtlich einer sehr raschen Regulation durch transkriptionelle Aktivierung, wie wir oben gezeigt haben. Oft haben solche schnell regulierten Gene kritische Schlüsselstellungen für zelluläre
- 20 Vorgänge inne.

Eine pharmakologische Beeinflussung von M30 kann über die folgenden Ansatzpunkte erfolgen:

1. eine Beeinflussung der Transkriptmenge von m30 in der Zelle, beispielsweise die Suppression der schnellen Hochregulation nach pathologischen Prozessen;
- 25 2. die Inhibierung einer enzymatischen Aktivität von M30, z.B. einer Kinase-Aktivität;
3. die Inhibierung einer Interaktion mit einem oder mehreren anderen Molekülen, insbesondere mit anderen Proteinen.

### 30 **Beispiel 13**

#### Beispiele für Identifizierung von Liganden

Mit Hilfe gängiger Interaktionsscreeningverfahren (z.B. yeast-two-hybrid System, Screenen von Expressionsbibliotheken mit dem *lambda-gt11*-System, Co-Immunpräzipitationen) können Proteininteraktionspartner von M30 identifiziert werden. Ein yeast-two-hybrid Screen kann beispielsweise unter Benutzung des *Matchmaker*-Systems der Fa. *Clontech* erfolgen. Dazu wird die cDNA von M30 in einen sog. *Bait*-Vektor kloniert (z.B. *pGBT10*). Eine Bibliothek in dem sog. *Prey*-Vektor (z.B. eine fötale Gehirnbank) kann dann nach einem Interaktionspartner durchsucht werden (siehe z.B. (Kuner, et al., *Science*, 283, 74-7, (1999))). Ein Screen von Expressionsbanken im Phagensystem kann anhand gängiger Protokolle (Ausubel et al., *Protocols in Molecular Biology*, New York, 1997) erfolgen. Nach Auffinden eines solchen Partners kann ein Assay für ein High-throughput-screening System (HTS) aufgebaut werden. Dieses kann benutzt werden, um Inhibitoren für die Interaktion von M30 mit seinem Partner zu finden, die die Funktion von M30 damit herabsetzen oder aufheben können. Dabei kann z.B. ein System benutzt werden, das den FRET Effekt benutzt (fluorescence resonance energy transfer). Dazu werden M30 und sein Interaktionspartner in Fusion mit Mutanten des Green fluorescent proteins (GFP) kloniert, z.B. BFP (blue fluorescent protein) und GFP (green fluorescent protein, S65T Mutante) (Mahajan, et al., *Nat Biotechnol*, 16, 547-52, (1998)). Es können auch CFP und YFP verwendet werden. Diese Fusionsproteine werden in Bakterien oder anderen Expressionssystemen (Baculoviren, Hefen) exprimiert und aufgereinigt, z.B. über einen Polyhistidintag und Nickelsäulen. Die beiden Proteine gibt man in einer Konzentration im Bereich von 100 nM zusammen. BFP ist hierbei der Donor (Excitation bei 389 nm) und GFP der Akzeptor (Emission bei 511 nm). Der FRET Effekt tritt bei Annäherung der beiden Proteine auf 50 – 10 Angström auf. Die Proteinmischung kann in Microtiterplatten pipettiert werden, und mit Substanzen einer chemischen Bank inkubiert werden. Dabei kann es auch von Vorteil sein, zunächst das M30 Fusionsprotein mit der chemischen Substanz vorzuinkubieren, und danach den Interaktionspartner zuzugeben. Eine Inhibition der Interaktion lässt sich dann über eine Abnahme des FRET-Effektes feststellen (Messung mit Photomultipliern oder Spektralphotometer). Eine Implementation eines High-throughput-screening Systems unter Ausnutzung des FRET-Effektes ist in (Mere, et al., *Drug Discov Today*, 4, 363-369, (1999)) beschrieben. Dieses Testsystem kann prinzipiell auch in Zellen erfolgen, unter Umständen ist dies erforderlich.

Prinzipiell kann auch ein HTS-System unter Benutzung des SPA (scintillation proximity assays) (Fa. Amersham) etabliert werden. Dabei würde ein Peptid des Interaktionspartners von M30 an SPA-beads gekoppelt werden. Ein Fusionsprotein aus M30 und der Konsensusphosphorylierungsstelle der Protein-Kinase-A (Sequenz RRASV) und einem Aufreinigungstag (z.B. Polyhistidintag) kann hergestellt und aufgereinigt werden. Durch Inkubation mit Proteinkinase A und 33P-ATP kann das M30 Fusionsprotein mit 33P markiert werden. Die SPA-beads können im Microtiterformat mit Substanzen aus einer kombinatorischen library inkubiert werden. Nach Zugabe des M30 Fusionsproteins kann die Szintillation, die durch Bindung des 33P-markierten M30 Fusionsproteins an den SPA-bead entsteht, gemessen werden. Ein Inhibitor der Interaktion würde den Szintillationseffekt unterdrücken.

Ähnliche Assays, die auf dem Prinzip einer Interaktionsinhibitor beruhen, sind im Prinzip gleichwertig, und können ebenfalls eingesetzt werden.

Insbesondere können diese Assay-Systeme für das Auffinden von Inhibitoren der Heterodimerisierung von M30-Familienmitgliedern (z.B. M30 und M32) benutzt werden.

#### **Beispiel 14:**

Interaktionsexperimente in Hefe mittels Kotransformationsexperimenten zum Nachweis der Interaktion von m30 mit Proteinkinasen des IL1-Signaltransduktionsweges

Zum Nachweis einer möglichen Interaktion von m30 mit Kinasen der IRAK-Familie wurden m30-Fragmente in die sog. Bait- und Prey-Vektoren für das yeast-2-hybrid-System kloniert.

Zur Herstellung der Prey-Konstrukte, die die m30-Fragmenten enthielten, wurden PCR-Reaktionen mit folgenden Primerpaaren mit dem Plasmid *m30-26* als Vorlage ("Template") durchgeführt:

Für die Amplifikation des Fragments m30\_1\_pGADT7 (n-terminal, Frag1.SEQ in Fig. 11) mittels PCR, das die aminoterminalen 525 bp umfaßt, wurde das Oligonukleotidpaar

m30\_Es\_s1 (GATC GAATTC TTT TCT CCT GAT CAA GAA; Seq ID NO 19) und m30\_Sa\_a2 (GATC GTCGAC GGA CGT CTT CCA TTT GGC; Seq ID NO 20) genutzt.

Für die Amplifikation des Fragments m30\_2\_pGADT7 (mittlerer Bereich, Frag2.SEQ in Fig. 11) mittels PCR, das die mittleren Nukleotide von 526 bis 903 bp umfaßt, wurde das Oligonukleotidpaar m30\_Es\_s2 (GATC GAATTC GCC AAA TGG AAG ACG TCC; Seq ID NO 21) und m30\_Sa\_a3 (GATC GTCGAC CCT CTT CAT GCT GGG GAA; Seq ID NO 22) verwendet.

Für die Amplifikation des Fragments m30\_3\_pGADT7 (C-terminus; Frag.3.SEQ in Fig. 11) mittels PCR, das die carboxyterminalen 384 bp (904 - 1287 bp) umfaßt, wurde das Oligonukleotidpaar m30\_E2\_s3 (GATC GAATTC TTC CCC AGC ATG AAG AGG; Seq ID NO 23) und m30\_Sa\_a1 (GATC GTCGAC GTC TAG AGG TCC TTG GAA; Seq ID NO 24) genutzt.

Für die Amplifikation des Fragments m30\_4\_pGADT7 (Volllänge, Frag4.SEQ in Fig. 11) mittels PCR, das die gesamten 1251 bp der m30-cDNA umfaßt, wurde das Oligonukleotidpaar m30\_Es\_s1 (GATC GAATTC TTT TCT CCT GAT CAA GAA) und m30\_Sa\_a1 (GATC GTCGAC GTC TAG AGG TCC TTG GAA) verwendet.

Für die Amplifikation des Fragments m30\_5\_pGADT7 (N-terminale 2/3 des Proteins, Frag5.SEQ in Fig. 11) mittels PCR, das die aminoterminalen 885 bp der m30-cDNA umfaßt, wurde das Oligonukleotidpaar m30\_Es\_s1 (GATC GAATTC TTT TCT CCT GAT CAA GAA) und m30\_Sa\_a3 (GATC GTCGAC CCT CTT CAT GCT GGG GAA) verwendet.

Die PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des *Qiagen-Qiaquick*-Protokolls nach Herstellerangaben aufgereinigt, und nach dem Schneiden mit EcoRI und Sall in den Prey-

Vektor *pGADT7* der Fa. *Clontech* ligiert. Die fehlerfreie Sequenz der erhaltenen Klone wurden durch Sequenzierung auf beiden Nukleotidsträngen bestätigt.

Für die Klonierung von *Pelle* in den *Bait*-Vektor (*pGBKT7*) wurde *Pelle* mittels PCR-Reaktion aus *Drosophila-Pelle*-Klonen (LD13069) amplifiziert. Hierfür wurden die Oligonukleotide *pelle(pgbkt7)**Nco*Is (GAT CTG CCA TGG GAT GAG TGG CGT CCA GAC CGC CGA A; Seq ID NO 25) und *pelle(pgbkt7)**eco*RIas (GAT CGA ATT CCT AGT CGG TAA CAA ACG GTT CGA A; Seq ID NO 26) genutzt.

Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Eco*RI verdaut und in den linearisierten *Bait*-Vektor *pGBKT7* ligiert. Zur Verifikation der fehlerfreien Sequenz des so erhaltenen Konstrukts wurden die PCR-generierten Bereiche des Konstrukts von beiden Seiten sequenziert.

Als Positivkontrolle wurden die bei der Firma *Clontech* kommerziell erhältlichen Positivkontrollen *SNF1* und *SNF4* benutzt. Als Negativkontrolle wurde das *Drosophila*-Protein *pellino* als *Bait* mit einer anderen Serin-Threonin-Kinase (9B5) kotransformiert, die keine direkte Homologie zu *Pelle* aufweist und daher nicht mit *Pellino* interagieren sollte.

Die Hefe-Kotransformationen in *HF7c*-Stämmen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Nach Aufwachsen einer Hefekolonie in einem Endvolumen von 50 ml YPD bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 – 0.6 werden die Hefezellen bei 3000 rpm 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wird mit 25 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, anschliessend werden die Hefezellen erneut pelletiert. Das Pellet wird mit 2.5 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, und erneut pelletiert. Danach werden die Hefezellen mit 5 ml *Lithium-Lösung* gewaschen (100 mM LiAcetat in TE Puffer (pH 7.6)). Das Pellet wird in 250 µl der *Lithium-Lösung* aufgenommen. Ca. 1 µg des *Bait*-Plasmids werden mit 1 µg des *Prey*-Plasmids, 50 µg denaturierter genomischer DNA aus Heringssperma, 50 µl der Hefe-Zellsuspension, und 300 µl einer PEG-Lösung (40% PEG MW 3500, 0.1 M LiAcetat, 1 x TE (pH 7.6)) für 30 min bei 30°C inkubiert. Danach wird die Mischung für 10 min bei 42°C inkubiert, und gelegentlich invertiert. Danach wird die

Mischung für 1 min auf 4°C temperiert, und anschließend durch Zentrifugation pelletiert (10.000 rpm, 20 sec). Das Pellet wird zweimal in 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, und dann in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert, und anschliessend auf Agarselektionsplatten ohne Tryptophan und ohne Leucin („-trp-leu“) und zusätzlich ohne Histidin („-trp-leu-his“) ausplattiert.

5

Die β-Galaktosidase-Färbung wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Von den Hefekolonien werden nach dreitägigem Wachstum auf Agar-Selektionsplatten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin auf einem Nitrozellulosefilter (Schleicher und Schüll) ein Replika-Abdruck gezogen. Der Filter wird nach kurzem Trocknen in flüssigen Stickstoff überführt, um die Zellen aufzubrechen. Die Filter werden dann bei 30°C in einer Lösung mit X-Gal inkubiert. Die Blaufärbung der positiven Kolonien erfolgt - je nach Stärke der Interaktion - nach einigen Minuten bis nach einigen Stunden.

15

20

25

Tabelle 2: Ergebnis der m30/pelle / IRAK Kotransformationen

Prey-Konstrukt	Bait-Konstrukt	Bemerkung	Wachstum auf - trp-leu-his Platten	Blaufärbung auf - trp-leu-his Platten (bgal-Reaktion)
pellino-pGADgh	pelle-pGBKT7		+	+
m30_1_pGADT7	pelle-pGBKT7		-	-
m30_2_pGADT7	pelle-pGBKT7		-	-
m30_3_pGADT7	pelle-pGBKT7		-	-
m30_4_pGADT7	pelle-pGBKT7		+	+
m30_5_pGADT7	pelle-pGBKT7		+	+
pellino-pGADgh	IRAK1_pGBKT7		+	+
pellino-pGADgh	9B5-pGBKT7	Negativkontrolle	-	-
SNF4	SNF1	Positivkontrolle	+	+

- 5 Aus diesem Ergebnis lässt sich schliessen, dass nicht nur das Drosophila-Protein *pellino* mit *pelle* interagiert, sondern daß auch das humane Homologe von *pellino* - m30 - mit *pelle*-homologen Proteinkinasen im Säugetier interagieren kann. Die Interaktion erfolgt hierbei vermutlich mit den aminoterminalen Proteinanteilen von m30 (siehe Lage der Fragmente Frag1.SEQ bis Frag.5.SEQ in Fig. 11 im Vergleich zu Tabelle 2). Weiterhin
- 10 konnte gezeigt werden, daß das Drosophila-Protein *Pellino* ebenfalls noch mit dem humanen IRAK1 interagieren kann. Dies zeigt, dass die Interaktion von m30-Homologen zu *pelle*-homologen Proteinen in den verschiedensten Organismen zu beobachten ist, was dafür spricht, daß diese Protein/Protein-Interaktionen zwischen m30-Homologen und *pelle*-Homologen wahrscheinlich eine sehr wichtige funktionelle Bedeutung haben.

- 59 -

Interessanterweise funktioniert die Interaktion von pelle mit pellino nur mit pellino als bait, nicht in der „umgekehrten“ Richtung, dies ist ein Phänomen, was bei vielen yeast-2-hybrid Screens beobachtet wird.



**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Diagnose neurodegenerativer Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet,  
5 daß die Konzentration eines Proteins , aufweisend eine der Sequenzen SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, oder eines Säugetier-Homologes dieses Proteins oder eines Muteins dieses Proteins, das über einen Bereich von 50 Aminosäuren seiner Aminosäuresequenz eine Sequenzidentität mit einer der Sequenzen von über 60 % aufweist, in einer Körperprobe bestimmt wird.
- 10 2. Protein, aufweisend eine Sequenz SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10 12, 14, 16, 18 oder ein Homologes oder Mutein desselben, das über einen Bereich von 189 Aminosäuren eine Sequenzidentität mit einer der Sequenzen von größer 55 %, vorzugsweise mit SEQ ID NO 16 von größer 81 % oder mit SEQ ID NO 14 von größer 69 %, aufweist oder ein Fusionsprotein eines solchen Proteins mit einem anderen Protein darstellt.
- 15 3. Protein, dessen Transkript mit einer Sonde umfassend einen Bereich von 20 Nukleotiden aus den Sequenzen SEQ ID NO 17, 15 13, 11, 9, 7, 5, 3, 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
4. Antikörper gegen ein Protein nach einem der Ansprüche 2 oder 3.
5. DNA-Konstrukt, umfassend Nukleinsäure codierend für ein Protein nach einem der  
20 Ansprüche 2 oder 3 und einen operativ damit verknüpften Promotor.
6. DNA-Konstrukt, umfassend einen Promotor und eine mit dem Promotor operativ verknüpfte Sequenz zur Kontrolle der Neusynthese des Proteins gemäß einem der Ansprüche 2 oder 3 in einer Zelle.
7. Verwendung eines Konstruktes nach einem der Ansprüche 5 oder 6 für die  
25 Gentherapie.
8. Zelle, enthaltend ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 5 oder 6.
9. Transgenes nichtmenschliches Wesen, aufweisend Zellen mit einem veränderten Gen in dem Genom der betreffenden Zelle, wobei der Wildtyp des Gens für ein Protein nach Anspruch 2 oder 3 codiert.
- 30 10. Verfahren zur Diagnose einer neurodegenerativen Krankheit oder der Anfälligkeit gegenüber dieser Krankheit, gekennzeichnet durch die Sequenzabweichung in einem

Gen, das für ein Protein nach einem der Ansprüche 2 oder 3 codiert, gegenüber dem Wildtyp.

11. Verfahren zur Diagnose von Karzinomen oder Sarkomen, insbesondere von Ovarialkrebs, gekennzeichnet durch den Nachweis der Überexpression eines Proteins nach SEQ ID NO 14 in einer Körperprobe.

12. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 2 oder 3 zur Suche nach Liganden, die an diese Proteine binden.

13. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein Yeast-Two-Hybrid-System eingesetzt wird.

14. Ligand, der mit einer Dissoziationskonstante von kleiner 1  $\mu$ M an ein Protein gemäß einem der Ansprüche 2 oder 3 bindet.

15. Verwendung eines Liganden nach Anspruch 14 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen und Erkrankungen des Immunsystems sowie von Karzinomen und Sarkomen.

16. Verwendung eines Liganden nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand das Protein IRAK-1 oder ein zu IRAK-1 homologes Protein ist.

17. Verwendung eines Liganden nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß dieser Ligand die Oligomerisierung von M30 und seinen Homologen zu Hetero- oder Homooligomeren beeinflusst.

18. Verwendung der Interaktion von M30 mit Proteinkinasen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen.

19. Verwendung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteinkinase eine Kinase aus der IRAK-Genfamilie oder eines ihrer Homologen oder Derivate ist.

20. Verwendung eines Inhibitors für ein Protein nach einem der Ansprüche 2 oder 3 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen.

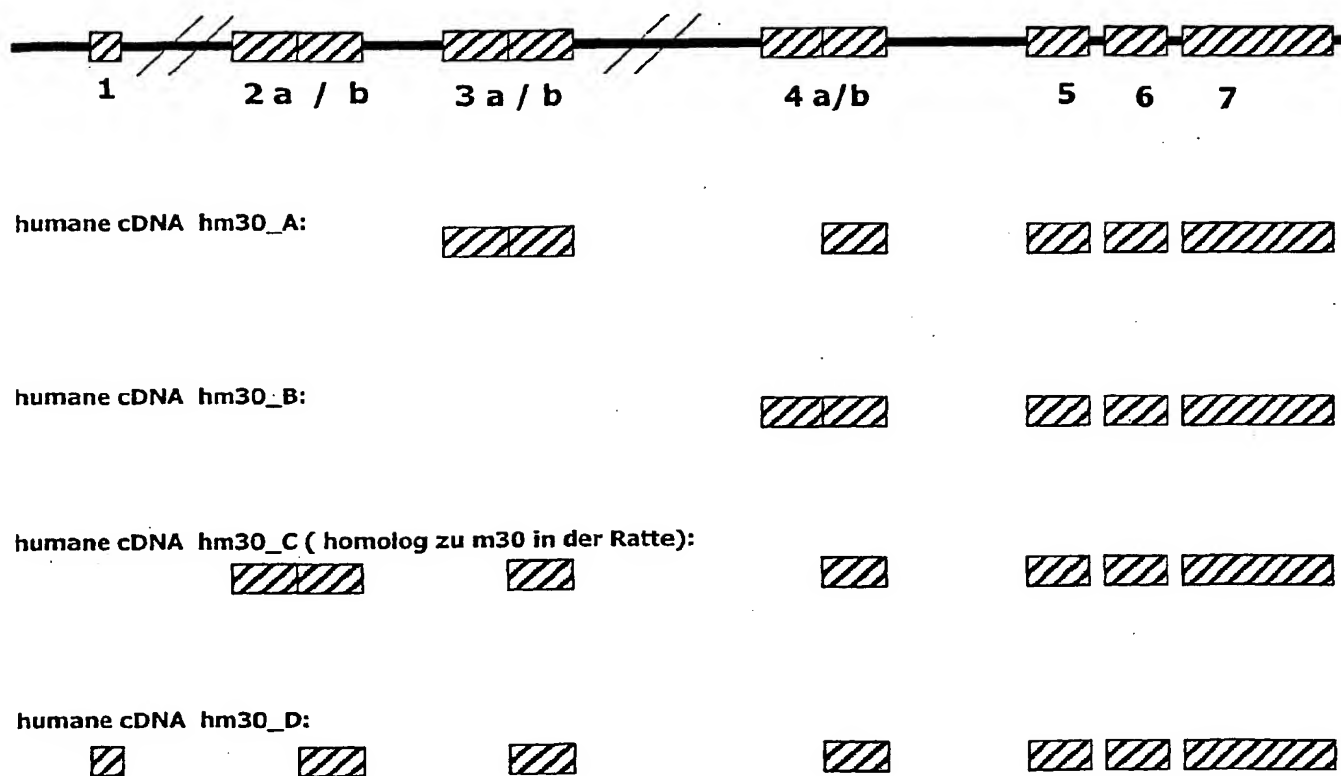
21. Verwendung eines Inhibitors für ein Protein nach einem der Ansprüche 2 oder 3 gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die neurodegenerative Erkrankung der Schlaganfall ist.

22. Arzneimittel enthaltend einen funktionalen Inhibitor für ein Protein nach einem der Ansprüche 2 oder 3.

23. Screening-Verfahren zur Identifikation und/oder zur Charakterisierung von funktionalen Inhibitoren und/oder von Liganden von M30 oder einem Homologen von M30, umfassend die folgenden Schritte

- a) Bereitstellung von Zellen, die M30 oder eines seiner Homologen überexprimieren
  - 5 b) Behandlung dieser Zellen mit einer Apoptose-auslösenden Substanz, insbesondere mit Staurosporin,
  - c) Behandlung eines Anteils der Zellen aus b) mit einer Substanz mit vermeintlicher Inhibitor-Funktion bezüglich M30 oder bezüglich eines seiner Homologen, während die restlichen Zellen aus b) unbehandelt bleiben,
  - 10 d) Durchführung eines vergleichenden Apoptose-Assays bei Extrakten aus Zellen, die nach c) mit einem Inhibitor-Kandidaten bzw. nicht mit einem Inhibitor-Kandidat behandelt wurden,
- wobei die Behandlung der Zellen nach b) gleichzeitig mit der Behandlung nach c) oder die Behandlungen nach b) und c) in beliebiger Reihenfolge nacheinander  
15 erfolgen können.

24. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Apoptose-Assay aus der Spaltung des PARP-Proteins und der anschließenden quantitativen Detektion der PARP-Spaltprodukte im Westernblot besteht.

**Figure 1**

### Figure 2

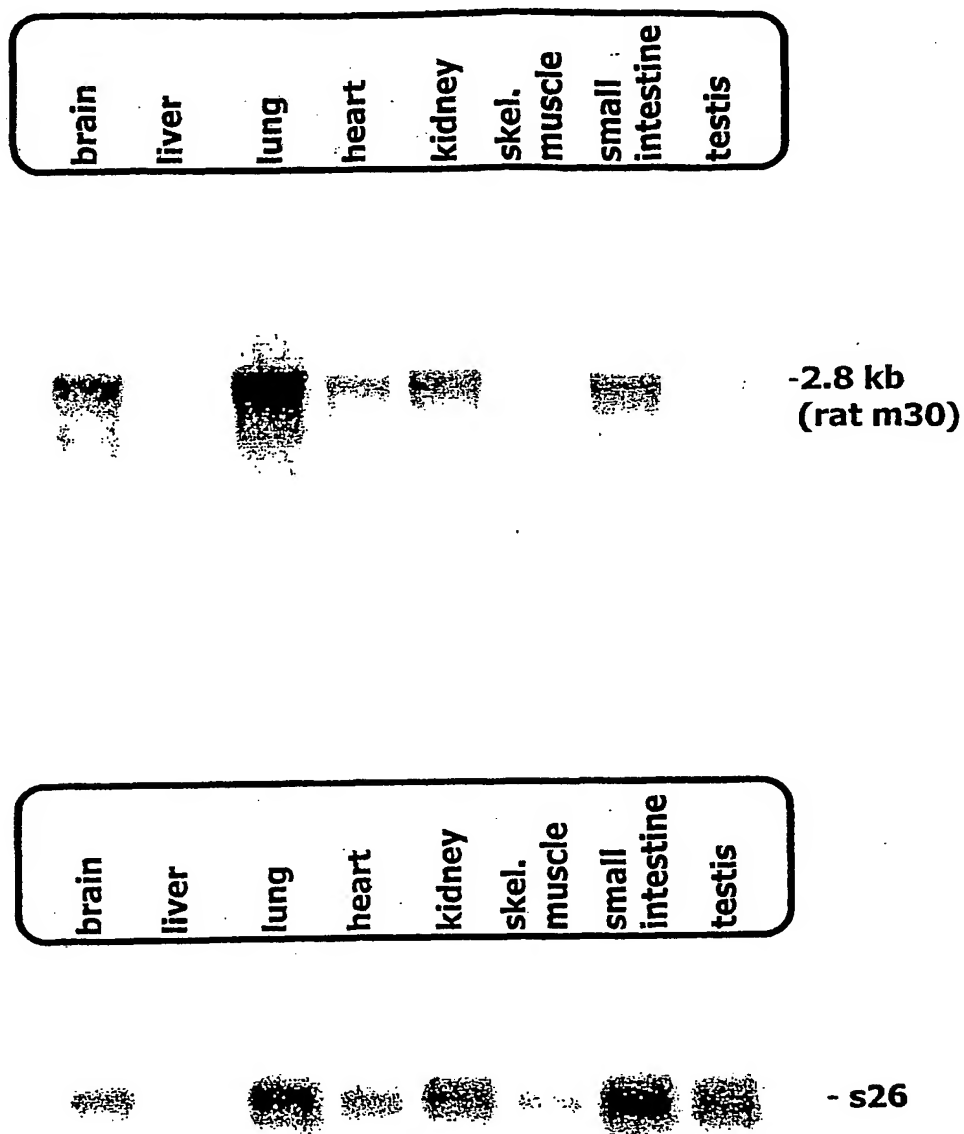


Figure 3

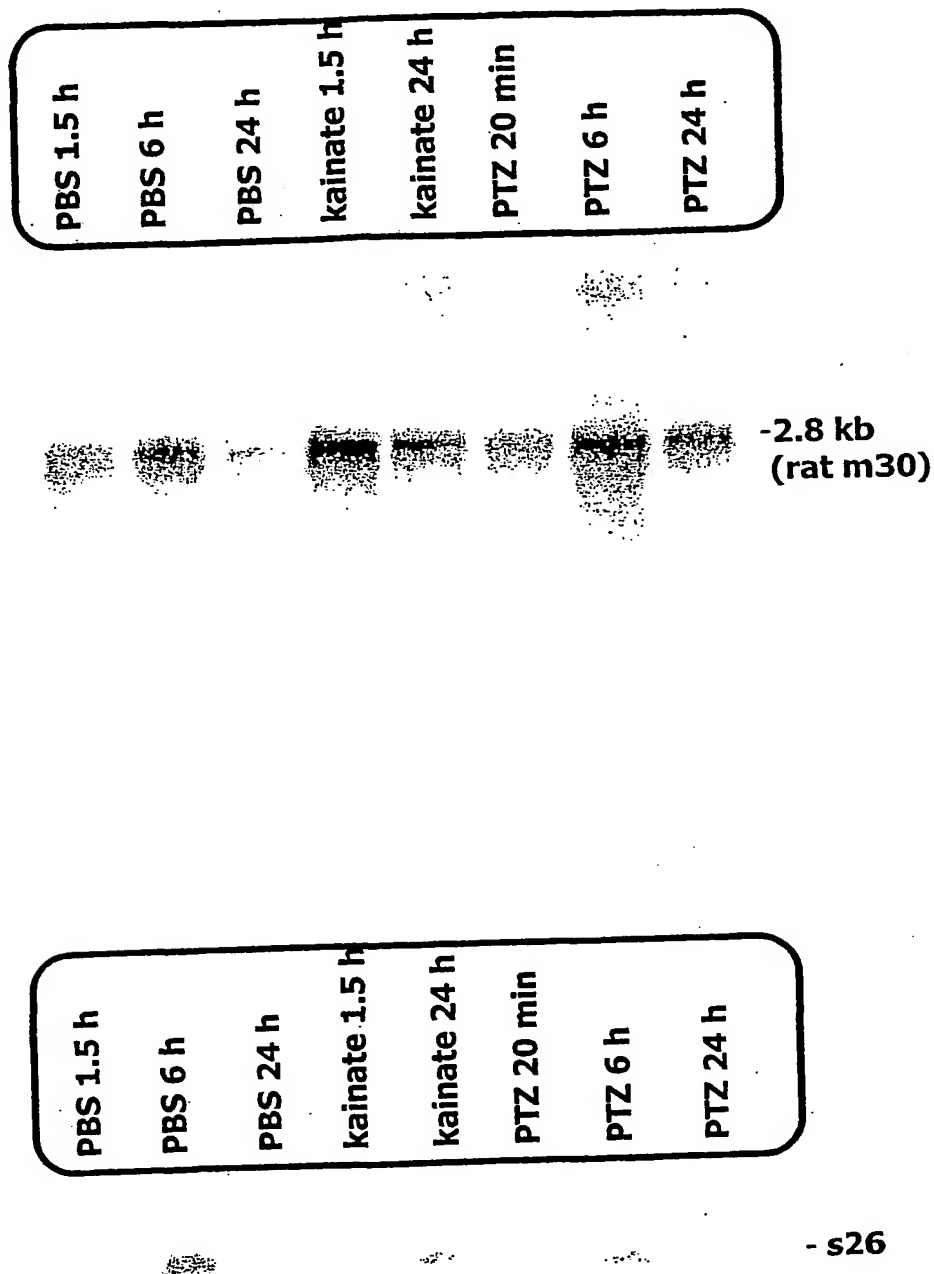
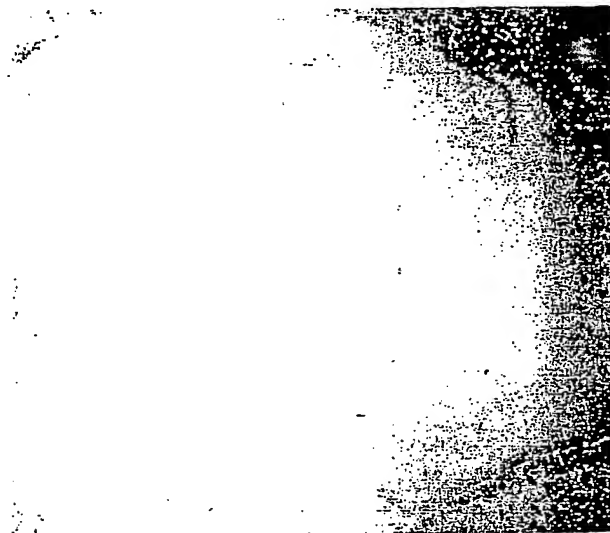
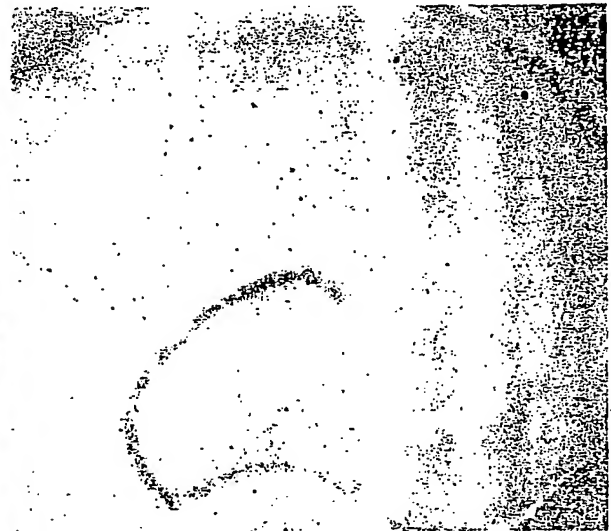


Figure 4

**1.5 h nach PBS-Injektion**



**1.5 h nach Kainat-Injektion**



**Figure 5**



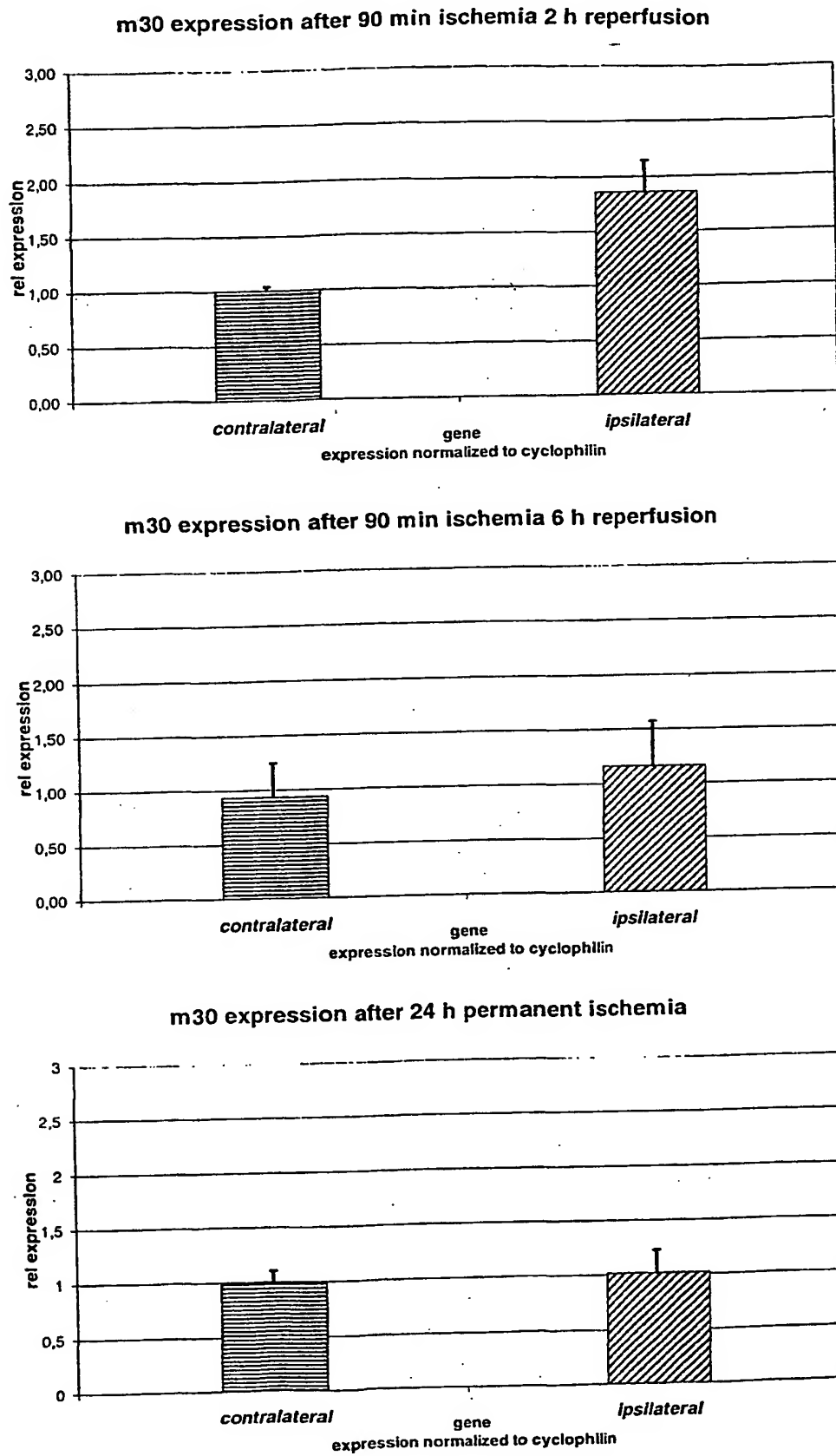


Figure 6

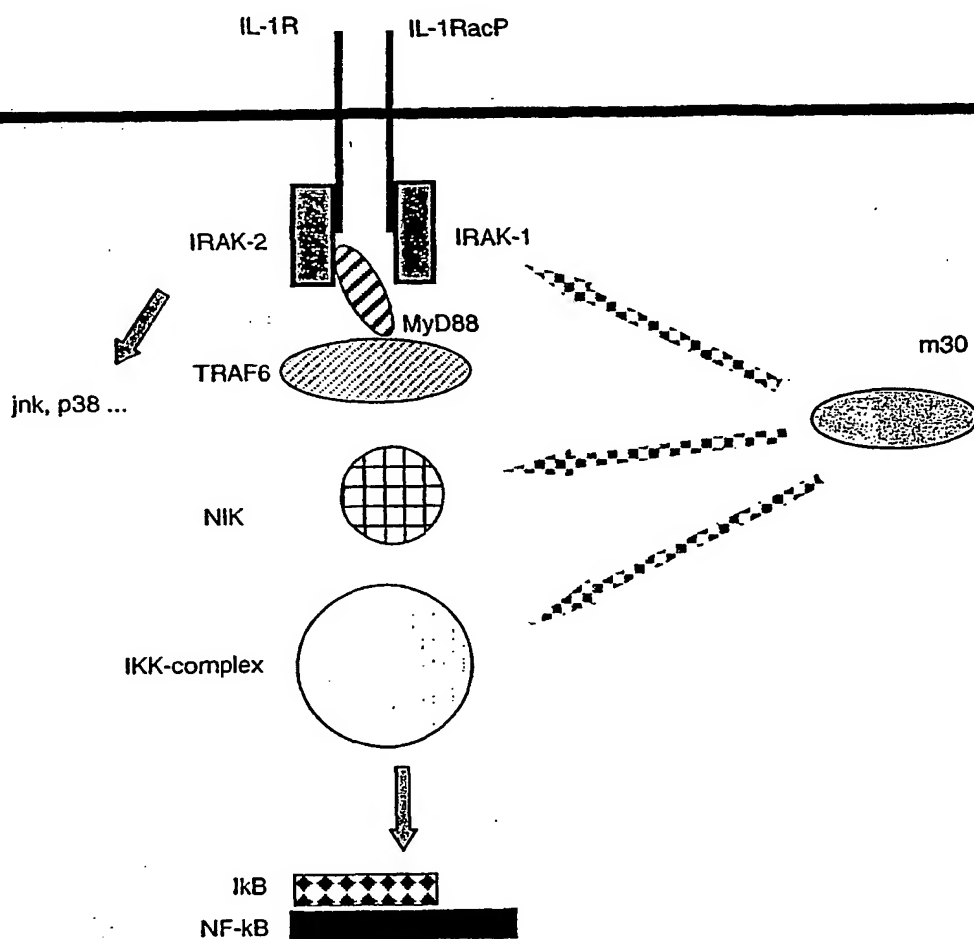
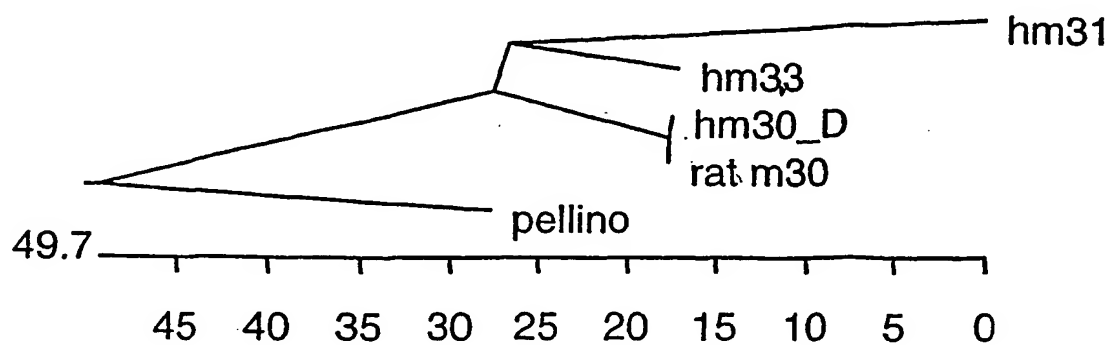


Figure 7

### Figure 8



	hm30_D	hm31	pellino	hm33	rat m30	
hm30_D	***	69.1	55.5	81.1	99.8	hm30_D
hm31	37.6	***	48.3	69.3	69.0	hm31
pellino	54.3	72.0	***	54.8	55.4	pellino
hm33	20.9	36.5	54.4	***	80.9	hm33
rat m30	0.2	37.4	54.1	20.9	***	rat m30
	hm30_D	hm31	pellino	hm33	rat m30	

Figure 9

10/11

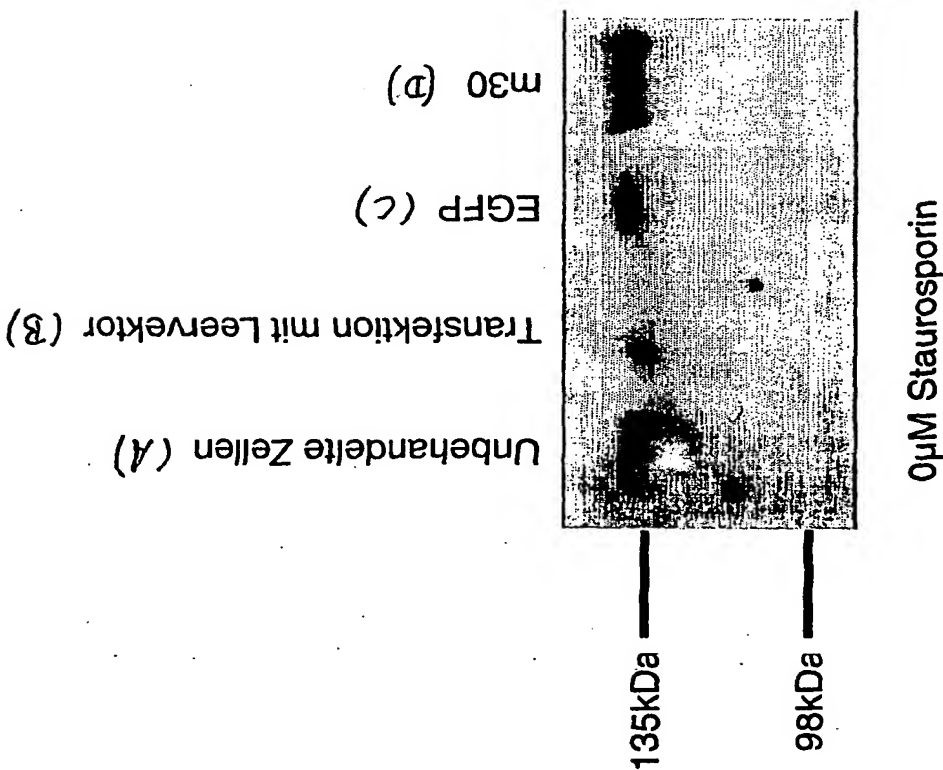


Fig 10: Induktion von Apoptose durch m30 nach Staurosporin in transient transfizierten COS-1 Zellen

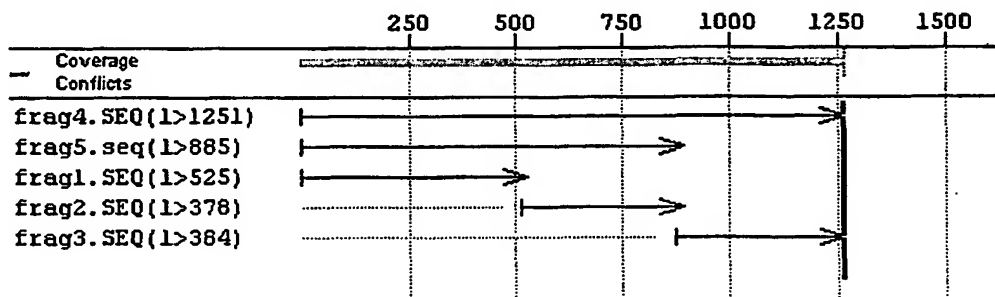


Fig 11: Position der Fragmente die für das y2h Experiment benutzt wurden, auf Nukleotidebene

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF-LYNX Bioscience AG

<120> M30-Genprodukte und ihre Verwendung

<130> BL60962 neu 28.08.00

<140>

<141>

<160> 55

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2736

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> CDS

<222> (585)..(1838)

<223> codierender Bereich der M30 cDNA der Ratte

<220>

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
für PCR-Reaktion zur Amplifikation von Cyclophilin

<400> 1

tttttttagcc cccctatctc ttctctctct ctctccctct ctctctctct ctctctctcg 60  
tcctctctct gctctctgta tctttctcta ttgttagtct ctatatccat ctctgtctct 120  
ctgtctctct gtctctctgt ctctgtctct gtctctctct ctctctctct ctctctctct 180  
ctctctctct ctctctcttg ctttcctaag ttcttcacag gggcacacaa atggaatgaa 240  
cacaataacc ttgcactaaa tagagggtcaa gggatgagga tgcagctggt ttgatggagt 300  
gctttcctaa caagaaggag acttggtttt catttcccag tgtcacacaa aactggtgac 360  
agtacatgct agtgagccta gcacatagga ggcagaaggg ggaaaccagg actttaaagg 420  
catcattggc tgcggccgca gaattctgcg gccgcgcaat cggcagtctg acgagaagga 480

ggtttagctc gtggtgatag caacaaaatt aaaaggaaat aatgcaaaag gtgtctcaag 540  
 gctcctgacc agtgaacaga gatttgagaa agacagccaa gctc atg ttt tct cct 596  
 Met Phe Ser Pro  
 1  
 gat caa gaa aat cat cct tcc aaa gcc cca gta aaa tat ggc gaa ctc 644  
 Asp Gln Glu Asn His Pro Ser Lys Ala Pro Val Lys Tyr Gly Glu Leu  
 5 10 15 20  
 att gtc tta ggg tat aat ggg tct ctc cca aac ggc gac aga gga agg 692  
 Ile Val Leu Gly Tyr Asn Gly Ser Leu Pro Asn Gly Asp Arg Gly Arg  
 25 30 35  
 agg aaa agt agg ttt gct ttg ttt aaa aga cct aag gca aat ggg gtg 740  
 Arg Lys Ser Arg Phe Ala Leu Phe Lys Arg Pro Lys Ala Asn Gly Val  
 40 45 50  
 aag cct agc acc gtg cac att gca tgc act cct cag gcc gcc aag gca 788  
 Lys Pro Ser Thr Val His Ile Ala Cys Thr Pro Gln Ala Ala Lys Ala  
 55 60 65  
 ata agc aac aag gac cag cat agc ata tcg tat act tta tct cga gcc 836  
 Ile Ser Asn Lys Asp Gln His Ser Ile Ser Tyr Thr Leu Ser Arg Ala  
 70 75 80  
 cag aca gtg gtg gtt gaa tat act cac gac agc aac act gat atg ttt 884  
 Gln Thr Val Val Val Glu Tyr Thr His Asp Ser Asn Thr Asp Met Phe  
 85 90 95 100  
 cag att ggc cgg tca act gaa agt cct att gat ttt gtg gta act gac 932  
 Gln Ile Gly Arg Ser Thr Glu Ser Pro Ile Asp Phe Val Val Thr Asp  
 105 110 115  
 aca gtt cct gga agt cag agt aat tcc gac acg cag tcc gta caa agc 980  
 Thr Val Pro Gly Ser Gln Ser Asn Ser Asp Thr Gln Ser Val Gln Ser  
 120 125 130  
 act ata tcg agg ttt gcc tgt agg atc att tgt gaa cgc aat cct ccc 1028  
 Thr Ile Ser Arg Phe Ala Cys Arg Ile Ile Cys Glu Arg Asn Pro Pro  
 135 140 145  
 ttt aca gct cgg att tat gct gca gga ttt gat tca tca aaa aac atc 1076  
 Phe Thr Ala Arg Ile Tyr Ala Ala Gly Phe Asp Ser Ser Lys Asn Ile  
 150 155 160  
 ttt ctt ggg gag aag gct gcc aaa tgg aag acg tcc gac ggg cag atg 1124  
 Phe Leu Gly Glu Lys Ala Ala Lys Trp Lys Thr Ser Asp Gly Gln Met



165	170	175	180	
gac ggc ctg acc acc aat gga gtt ctt gtg atg cat cca cgc gat ggg				1172
Asp Gly Leu Thr Thr Asn Gly Val Leu Val Met His Pro Arg Asp Gly				
	185	190	195	
ttc aca gaa gac tcc aag cct gga ata tgg aga gag ata tcc gta tgt				1220
Phe Thr Glu Asp Ser Lys Pro Gly Ile Trp Arg Glu Ile Ser Val Cys				
	200	205	210	
ggg aac gtc ttc agt ctg cgt gaa acc aga tca gcg caa cag aga gga				1268
Gly Asn Val Phe Ser Leu Arg Glu Thr Arg Ser Ala Gln Arg Gly				
	215	220	225	
aag atg gtg gaa atc gaa acc aat cag ctg caa gat ggc tcc tta atc				1316
Lys Met Val Glu Ile Glu Thr Asn Gln Leu Gln Asp Gly Ser Leu Ile				
	230	235	240	
gac ctc tgt ggt gca acc ctg ctg tgg cgc aca gca gaa ggc ctt tcc				1364
Asp Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp Arg Thr Ala Glu Gly Leu Ser				
	245	250	255	260
cac acc cct act gtg aaa cac tta gaa gct ctg aga cag gag atc aat				1412
His Thr Pro Thr Val Lys His Leu Glu Ala Leu Arg Gln Glu Ile Asn				
	265	270	275	
gca gct cgg cct cag tgc cct gta ggc ttc aac aca cta gcc ttc ccc				1460
Ala Ala Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Phe Asn Thr Leu Ala Phe Pro				
	280	285	290	
agc atg aag agg aaa gat gtt gta gat gag aag caa cca tgg gta tat				1508
Ser Met Lys Arg Lys Asp Val Val Asp Glu Lys Gln Pro Trp Val Tyr				
	295	300	305	
ctg aac tgc ggc cat gtt cat ggt tac cat aac tgg gga aac aag gaa				1556
Leu Asn Cys Gly His Val His Gly Tyr His Asn Trp Gly Asn Lys Glu				
	310	315	320	
gaa cgt gac ggc aaa gat cgt gaa tgt cct atg tgt agg tct gtt ggt				1604
Glu Arg Asp Gly Lys Asp Arg Glu Cys Pro Met Cys Arg Ser Val Gly				
	325	330	335	340
ccc tat gtc cct ctg tgg ctt gga tgt gaa gct gga ttt tat gtg gac				1652
Pro Tyr Val Pro Leu Trp Leu Gly Cys Glu Ala Gly Phe Tyr Val Asp				
	345	350	355	
gcc ggc cct ccc acc cat gcc ttt agc ccc tgt ggg cat gtg tgt tca				1700
Ala Gly Pro Pro Thr His Ala Phe Ser Pro Cys Gly His Val Cys Ser				

360

365

370

gaa aag aca acg gct tac tgg tcc cag atc ccg ctt cct cat ggt acg 1748  
 Glu Lys Thr Thr Ala Tyr Trp Ser Gln Ile Pro Leu Pro His Gly Thr  
 375 380 385

cac act ttt cac gca gcc tgt ccc ttc tgt gca cat cag ttg gct ggt 1796  
 His Thr Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Ala His Gln Leu Ala Gly  
 390 395 400

gaa caa ggc tat atc aga ctt att ttc caa gga cct cta gac 1838  
 Glu Gln Gly Tyr Ile Arg Leu Ile Phe Gln Gly Pro Leu Asp  
 405 410 415

tagcagctgt cctccaggac tgcattacaa gttcataagc taagtgattg ggtttgccga 1898

ccccctgtcc gtgtaagttt ctctgctctg gtcatttgca ttaagatgaa gaattttttt 1958

aaatatttat aatagcaatt tctgagaaaa atttgggaaa ctcgagaaaa ggaatatttg 2018

aaagttccag acttctgaat tctgagtttt gaaaatctat tttgaggaaa aaaagacatc 2078

gtctaatttg atgccttcgt ttagtggttct tgaatccctg ctcaccctca gtgttgagag 2138

gttggtctgt agaactgagg gtctgttggt tcaaactatg ttagtttaca atttggtgca 2198

aacattgtaa aatacagcaa catgtatatt aattttctat ttatctttat catagaaaat 2258

acottagaat gttgtgatag gtagcatggt aatgatggtg tcacacactt ggtgtgagtg 2318

gtaggttagt gggcacgcag ctcaaggatt tgcaaagtta aggagaaagg taggagagct 2378

ccccagccc catacaagta ggggatttga tgaactagaa tatttcataa aaccagattc 2438

acattaatta ccattgtcta aaaggtgttt gtttttaacc acattgaatt taaccagaaa 2498

atgggttttt ccttcatggt tctctcaagt gtagtactat aacaaaagtt aatgctaaga 2558

aacgttttat atgctccttt gaatatgcaa ttaatctaga tgatctatctt ttctcccatg 2618

ataactgata tgttttttagt gccagcaaca tttggcaagt ttattttttt ggatataaac 2678

tgtgggttcat ctgttcactg tttctaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2736

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 418

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
für PCR-Reaktion zur Amplifikation von Cyclophilin

&lt;400&gt; 2

Met Phe Ser Pro Asp Gln Glu Asn His Pro Ser Lys Ala Pro Val Lys  
1 5 10 15

Tyr Gly Glu Leu Ile Val Leu Gly Tyr Asn Gly Ser Leu Pro Asn Gly  
20 25 30

Asp Arg Gly Arg Arg Lys Ser Arg Phe Ala Leu Phe Lys Arg Pro Lys  
35 40 45

Ala Asn Gly Val Lys Pro Ser Thr Val His Ile Ala Cys Thr Pro Gln  
50 55 60

Ala Ala Lys Ala Ile Ser Asn Lys Asp Gln His Ser Ile Ser Tyr Thr  
65 70 75 80

Leu Ser Arg Ala Gln Thr Val Val Val Glu Tyr Thr His Asp Ser Asn  
85 90 95

Thr Asp Met Phe Gln Ile Gly Arg Ser Thr Glu Ser Pro Ile Asp Phe  
100 105 110

Val Val Thr Asp Thr Val Pro Gly Ser Gln Ser Asn Ser Asp Thr Gln  
115 120 125

Ser Val Gln Ser Thr Ile Ser Arg Phe Ala Cys Arg Ile Ile Cys Glu  
130 135 140

Arg Asn Pro Pro Phe Thr Ala Arg Ile Tyr Ala Ala Gly Phe Asp Ser  
145 150 155 160

Ser Lys Asn Ile Phe Leu Gly Glu Lys Ala Ala Lys Trp Lys Thr Ser  
165 170 175

Asp Gly Gln Met Asp Gly Leu Thr Thr Asn Gly Val Leu Val Met His  
180 185 190

Pro Arg Asp Gly Phe Thr Glu Asp Ser Lys Pro Gly Ile Trp Arg Glu  
195 200 205

Ile Ser Val Cys Gly Asn Val Phe Ser Leu Arg Glu Thr Arg Ser Ala  
210 215 220

Gln Gln Arg Gly Lys Met Val Glu Ile Glu Thr Asn Gln Leu Gln Asp

225	230	235	240
Gly Ser Leu Ile Asp Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp Arg Thr Ala			
245	250	255	
Glu Gly Leu Ser His Thr Pro Thr Val Lys His Leu Glu Ala Leu Arg			
260	265	270	
Gln Glu Ile Asn Ala Ala Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Phe Asn Thr			
275	280	285	
Leu Ala Phe Pro Ser Met Lys Arg Lys Asp Val Val Asp Glu Lys Gln			
290	295	300	
Pro Trp Val Tyr Leu Asn Cys Gly His Val His Gly Tyr His Asn Trp			
305	310	315	320
Gly Asn Lys Glu Glu Arg Asp Gly Lys Asp Arg Glu Cys Pro Met Cys			
325	330	335	
Arg Ser Val Gly Pro Tyr Val Pro Leu Trp Leu Gly Cys Glu Ala Gly			
340	345	350	
Phe Tyr Val Asp Ala Gly Pro Pro Thr His Ala Phe Ser Pro Cys Gly			
355	360	365	
His Val Cys Ser Glu Lys Thr Thr Ala Tyr Trp Ser Gln Ile Pro Leu			
370	375	380	
Pro His Gly Thr His Thr Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Ala His			
385	390	395	400
Gln Leu Ala Gly Glu Gln Gly Tyr Ile Arg Leu Ile Phe Gln Gly Pro			
405	410	415	

Leu Asp

<210> 3  
 <211> 3846  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1022)..(1981)

<223> codierender Bereich der M30 cDNA Variante A des  
Menschen

<400> 3

```

aaaatgggga cagtgatttc aatctagtag aatttttgca agggtagatt tagtgaggtg 60
atgtgtatgg gatagccttc aatagtcctt ggtacatagt aaacacccaa atatttttat 120
tttgttttta acttgtttcc attggtttag tacttgctta cttttaggat gtatatgtgt 180
gtgtgtgtat gtgtacatgt tatggagaaa tggtcataag atctgaacaa caaaagtatg 240
tttactactt agcaaacatg tctgttggac aggttctgct aacataatga gagtgcattt 300
gtacattcag gtagctaaga cttaacaaat ctaaaaattc cttacttcaa aagttcagct 360
atttaaagtg tttggttcac aattaaagga gattgtgttt taaacaatac atactgtact 420
ttttaaaggt tgtattagca catgcaaaca gttcacctta aaaaaacaga atgagtcata 480
aggagtcaga catgccatta atcagctctt aattatcttc cataaaagag ggaaggaaaa 540
aatagagat aacacgaatc tgtgtataat ccaaaagggt ctctgtgact tggaatgaag 600
ccagaaaaag aatctcattt tgtttcacac actggcacct ggtatggaga tcaacagttg 660
ctcaaaggaa ttttaaataa ttataatgtg ttaatagata attaattggg aattgattct 720
gcaaggcaaa gtcaaacatt tgttttataa ttgtgcagtt cttgcaagag atcacctata 780
ctttttttcc cccatcaggt ataatgggtc tctcccaaat ggcgatagag gaaggaggaa 840
aagtaggttt gctttgttta aaagacctaa ggcaaattgg gtgaagccca gcactgtgca 900
tattgcttgt actcctcagg ctgcaaaggc aataagcaac aaagaccagc atagcatatc 960
atatactttg tctcggggcc agactgtggt ggttgaatat actcatgaca gcaacacaga 1020

t atg ttt cag att ggc cgg tcg act gaa agc ccc att gat ttt gta gta 1069
Met Phe Gln Ile Gly Arg Ser Thr Glu Ser Pro Ile Asp Phe Val Val
      1             5             10             15

act gac acg gtt cct gga agt caa agt aat tct gat aca cag tca gta 1117
Thr Asp Thr Val Pro Gly Ser Gln Ser Asn Ser Asp Thr Gln Ser Val
      20             25             30

caa agc act ata tca aga ttt gcc tgc aga atc ata tgt gaa cgg aat 1165
Gln Ser Thr Ile Ser Arg Phe Ala Cys Arg Ile Ile Cys Glu Arg Asn

```

35	40	45	
cct ccc ttt aca gca cgg att tat gct gca gga ttt gac tca tca aaa			1213
Pro Pro Phe Thr Ala Arg Ile Tyr Ala Ala Gly Phe Asp Ser Ser Lys			
50	55	60	
aac atc ttt ctt ggg gag aag gct gcc aaa tgg aag aca tca gat gga			1261
Asn Ile Phe Leu Gly Glu Lys Ala Ala Lys Trp Lys Thr Ser Asp Gly			
65	70	75	80
cag atg gat ggc ttg acc act aat ggt gtt ctt gtg atg cat cca cgc			1309
Gln Met Asp Gly Leu Thr Thr Asn Gly Val Leu Val Met His Pro Arg			
85	90	95	
aat ggg ttc aca gaa gac tcc aag cct gga ata tgg aga gaa ata tcg			1357
Asn Gly Phe Thr Glu Asp Ser Lys Pro Gly Ile Trp Arg Glu Ile Ser			
100	105	110	
gtg tgt gga aat gta ttt agc cta cgt gaa acc aga tcg gct cag cag			1405
Val Cys Gly Asn Val Phe Ser Leu Arg Glu Thr Arg Ser Ala Gln Gln			
115	120	125	
aga gga aaa atg gtg gaa att gaa acc aat cag tta caa gat ggc tcg			1453
Arg Gly Lys Met Val Glu Ile Glu Thr Asn Gln Leu Gln Asp Gly Ser			
130	135	140	
tta att gac ctc tgt ggt gca aca ttg tta tgg cgt act gca gaa ggc			1501
Leu Ile Asp Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp Arg Thr Ala Glu Gly			
145	150	155	160
ctt tcc cac act cct acc gtg aag cat tta gaa gct tta aga cag gaa			1549
Leu Ser His Thr Pro Thr Val Lys His Leu Glu Ala Leu Arg Gln Glu			
165	170	175	
atc aat gca gca cga cct cag tgc cct gta ggg ttc aac aca cta gca			1597
Ile Asn Ala Ala Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Phe Asn Thr Leu Ala			
180	185	190	
ttt cct agt atg aag agg aaa gac gtt gta gat gaa aaa caa cca tgg			1645
Phe Pro Ser Met Lys Arg Lys Asp Val Val Asp Glu Lys Gln Pro Trp			
195	200	205	
gta tat cta aac tgc ggc cat gta cat ggc tat cat aac tgg gga aac			1693
Val Tyr Leu Asn Cys Gly His Val His Gly Tyr His Asn Trp Gly Asn			
210	215	220	
aaa gaa gaa cgt gat gga aaa gat cgt gaa tgt cct atg tgt agg tct			1741
Lys Glu Glu Arg Asp Gly Lys Asp Arg Glu Cys Pro Met Cys Arg Ser			

225	230	235	240	
gtt ggt ccc tat gtt cct ctg tgg ctt gga tgt gaa gct gga ttt tat				1789
Val Gly Pro Tyr	Val Pro Leu Trp Leu Gly Cys Glu Ala Gly Phe Tyr			
245	250	255		
gtg gac gcc ggc cct cca acc cat gcg ttt agc ccg tgt ggg cat gtg				1837
Val Asp Ala Gly Pro Pro Thr His Ala Phe Ser Pro Cys Gly His Val				
260	265	270		
tgt tca gaa aag aca act gcc tat tgg tcc cag atc cca ctt cct cat				1885
Cys Ser Glu Lys Thr Thr Ala Tyr Trp Ser Gln Ile Pro Leu Pro His				
275	280	285		
ggt act cat act ttt cat gca gcc tgt ccc ttt tgt gca cat cag ttg				1933
Gly Thr His Thr Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Ala His Gln Leu				
290	295	300		
gct ggt gaa caa ggc tac atc aga ctt att ttt caa gga cct cta gac				1981
Ala Gly Glu Gln Gly Tyr Ile Arg Leu Ile Phe Gln Gly Pro Leu Asp				
305	310	315	320	
taacagacca ttgtcttgca ggactacatt ataaatttat aagctaagtg agttgggttt 2041				
tcgaacctgt tgtccacgtc acagtttttc tgctctggtc atttgcatta agatgaagaa 2101				
ttttttaaaa catttataat aaatagtagc aatttctgag caaaaatctg ggaaactcaa 2161				
gcaaaggaat ttctgaaagt atcagtccttc tgaattctga gttttgaaaa tatattttga 2221				
ggagaaaaag acatagtcta atttgatgcc ttcccttttag tgtttttgaa tcacctatcc 2281				
tcagtgctga aattgttttg tataactgag ggtactgttg gttcaaacta tgtagttta 2341				
cagtttggtg caaacattgt aaaatacagc gacatgtata ttaacttttt tctattttatc 2401				
tttattatag aaaatacctt agaatgttct tgatagagta gcatggtaac gatgggtgtca 2461				
cacccttggt gtgaatggta gcttagtgag caacctagct caaggatttg caaagttagg 2521				
aagaaggacg agagagcctc tctccccacc ccaatctaaa tatggaattt ggtaaattag 2581				
aatactttgt aatttgtaag accaaattca tactaattac ccgcgtgaaa ggtgtttggt 2641				
tttaacaaca ttgaagataa tcaggaaaga ttttttctta atgtttctct cgagcgtagt 2701				
actataacaa aaacttaatg ctaagaaaca ttttatatgc tcctttggat atgcaattta 2761				

atctagatta tctatTTTTtC tcccatgata actaatctgt ttttagtatc agcagcattt 2821  
 ggcaagtTTta ttttttggat ataaactgtg gttcatctgt tcaactgttC tagaaaaaaa 2881  
 tcattgccat aagaaaaagt ataaattagc aagaaaggag agtgacttga tttgcttttg 2941  
 gaaaaagaaa tgcttaatta attattctgt atttggcctt attcgggcat taggaaatct 3001  
 agagatctaa agggttgaat gacaatagtg cccccgtttt tagcagacca gccttaactC 3061  
 tgggtttgaa tcctaaggag attgccacag tgagacttaa ggaaatgttt ggttggcaga 3121  
 tgagcaccaa tgactgcagc gtggagtgc gcaactgcag gtctgtttat tctctaattC 3181  
 caatatgtct tttgcttcca gaagcaagaa aagtttcttc tctccctcc tccccacct 3241  
 tttttcaaag gcaccacaag tatagacagt tgcactacat caaatctttt tttgacactt 3301  
 gtagaaacca gtacactttt agattagaca gtatcttctt ttaatatTTt gatttgTTTT 3361  
 cctttagttt gaaaagtTgt ataacttta actgactgta gcaaagtTTt atatgtggta 3421  
 gcataccttt aatttatcct attacaaaac tgttctgaat tttcttttgg tttttaaaaa 3481  
 acaaaaacttg ttgcttagaa gccatgaatt attttatttt acttcaactg tcgaaaacttC 3541  
 cttgttttaa aaaatgatca tttgggttca ctcaggaaat gcatgtcagg aaacttgTat 3601  
 tataagttta ttagttgtga tgtatcagta actgctgtta cccctttttC aaagaaatgt 3661  
 aattgatttt gaagttttct agattgtcac atgctttgtg actaatgcaa gaaagcaagt 3721  
 cctgtgttgt atttgttcta gtcattttta ttcaggctat atattgtagc ttaattttta 3781  
 tttgcaatta atttatttaa actaagtaaa tacttttcaa aatacataat tgaaaaaaaa 3841  
 aaaaa 3846

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 320

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Phe Gln Ile Gly Arg Ser Thr Glu Ser Pro Ile Asp Phe Val Val

1 5 10 15



Thr	Asp	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Gln	Ser	Asn	Ser	Asp	Thr	Gln	Ser	Val	20	25	30	
Gln	Ser	Thr	Ile	Ser	Arg	Phe	Ala	Cys	Arg	Ile	Ile	Cys	Glu	Arg	Asn	35	40	45	
Pro	Pro	Phe	Thr	Ala	Arg	Ile	Tyr	Ala	Ala	Gly	Phe	Asp	Ser	Ser	Lys	50	55	60	
Asn	Ile	Phe	Leu	Gly	Glu	Lys	Ala	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr	Ser	Asp	Gly	65	70	75	80
Gln	Met	Asp	Gly	Leu	Thr	Thr	Asn	Gly	Val	Leu	Val	Met	His	Pro	Arg	85	90	95	
Asn	Gly	Phe	Thr	Glu	Asp	Ser	Lys	Pro	Gly	Ile	Trp	Arg	Glu	Ile	Ser	100	105	110	
Val	Cys	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Leu	Arg	Glu	Thr	Arg	Ser	Ala	Gln	Gln	115	120	125	
Arg	Gly	Lys	Met	Val	Glu	Ile	Glu	Thr	Asn	Gln	Leu	Gln	Asp	Gly	Ser	130	135	140	
Leu	Ile	Asp	Leu	Cys	Gly	Ala	Thr	Leu	Leu	Trp	Arg	Thr	Ala	Glu	Gly	145	150	155	160
Leu	Ser	His	Thr	Pro	Thr	Val	Lys	His	Leu	Glu	Ala	Leu	Arg	Gln	Glu	165	170	175	
Ile	Asn	Ala	Ala	Arg	Pro	Gln	Cys	Pro	Val	Gly	Phe	Asn	Thr	Leu	Ala	180	185	190	
Phe	Pro	Ser	Met	Lys	Arg	Lys	Asp	Val	Val	Asp	Glu	Lys	Gln	Pro	Trp	195	200	205	
Val	Tyr	Leu	Asn	Cys	Gly	His	Val	His	Gly	Tyr	His	Asn	Trp	Gly	Asn	210	215	220	
Lys	Glu	Glu	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Arg	Glu	Cys	Pro	Met	Cys	Arg	Ser	225	230	235	240
Val	Gly	Pro	Tyr	Val	Pro	Leu	Trp	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala	Gly	Phe	Tyr	245	250	255	
Val	Asp	Ala	Gly	Pro	Pro	Thr	His	Ala	Phe	Ser	Pro	Cys	Gly	His	Val	260	265	270	

Cys Ser Glu Lys Thr Thr Ala Tyr Trp Ser Gln Ile Pro Leu Pro His  
 275 280 285

Gly Thr His Thr Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Ala His Gln Leu  
 290 295 300

Ala Gly Glu Gln Gly Tyr Ile Arg Leu Ile Phe Gln Gly Pro Leu Asp  
 305 310 315 320

<210> 5

<211> 3254

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (441)..(1400)

<223> codierender Bereich der M30 cDNA Variante B des  
 Menschen

<400> 5

tgaggtagga gaaccacttg aacctgggag gcggcgggtg cagtgaaccc gagattgcac 60  
 cactgcactc cagcctaggc aacagagcaa gactctgtct ttaaaaaaaaa agaaagaaag 120  
 ttatgttttt attctgtaac tgcttctaaa tattcttcag taccccatc aacccgagaa 180  
 actactgtca cagctgacag gagttattaa cctctctaaa tttcaggggg aaaatgtata 240  
 aatatgtcat gtatttgata aatagttttc cctttttttt aatgaaaaga ttatctgatt 300  
 ggattgacct gcctactaat ttttgctatt aactttttca ttcttaggca ataagcaaca 360  
 aagaccagca tagcatatca tatactttat ctcgggccca gactgtggtg gttgaatata 420  
 ctcatgacag caacaccgat atg ttt cag att ggc cgg tcg act gaa agc ccc 473  
 Met Phe Gln Ile Gly Arg Ser Thr Glu Ser Pro  
 1 5 10

att gat ttt gta gta act gac acg gtt cct gga agt caa agt aat tct 521  
 Ile Asp Phe Val Val Thr Asp Thr Val Pro Gly Ser Gln Ser Asn Ser  
 15 20 25

gat aca cag tca gta caa agc act ata tca aga ttt gcc tgc aga atc 569  
 Asp Thr Gln Ser Val Gln Ser Thr Ile Ser Arg Phe Ala Cys Arg Ile  
 30 35 40

ata tgt gaa cgg aat cct ccc ttt aca gca cgg att tat gct gca gga	617
Ile Cys Glu Arg Asn Pro Pro Phe Thr Ala Arg Ile Tyr Ala Ala Gly	
45 50 55	
ttt gac tca tca aaa aac atc ttt ctt ggg gag aag gct gcc aaa tgg	665
Phe Asp Ser Ser Lys Asn Ile Phe Leu Gly Glu Lys Ala Ala Lys Trp	
60 65 70 75	
aag aca tca gat gga cag atg gat ggc ttg acc act aat ggt gtt ctt	713
Lys Thr Ser Asp Gly Gln Met Asp Gly Leu Thr Thr Asn Gly Val Leu	
80 85 90	
gtg atg cat cca cgc aat ggg ttc aca gaa gac tcc aag cct gga ata	761
Val Met His Pro Arg Asn Gly Phe Thr Glu Asp Ser Lys Pro Gly Ile	
95 100 105	
tgg aga gaa ata tcg gtg tgt gga aat gta ttt agc cta cgt gaa acc	809
Trp Arg Glu Ile Ser Val Cys Gly Asn Val Phe Ser Leu Arg Glu Thr	
110 115 120	
aga tcg gct cag cag aga gga aaa atg gtg gaa att gaa acc aat cag	857
Arg Ser Ala Gln Gln Arg Gly Lys Met Val Glu Ile Glu Thr Asn Gln	
125 130 135	
tta caa gat ggc tcg tta att gac ctc tgt ggt gca aca ttg tta tgg	905
Leu Gln Asp Gly Ser Leu Ile Asp Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp	
140 145 150 155	
cgt act gca gaa ggc ctt tcc cac act cct acc gtg aag cat tta gaa	953
Arg Thr Ala Glu Gly Leu Ser His Thr Pro Thr Val Lys His Leu Glu	
160 165 170	
gct tta aga cag gaa atc aat gca gca cga cct cag tgc cct gta ggg	1001
Ala Leu Arg Gln Glu Ile Asn Ala Ala Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly	
175 180 185	
ttc aac aca cta gca ttt cct agt atg aag agg aaa gac gtt gta gat	1049
Phe Asn Thr Leu Ala Phe Pro Ser Met Lys Arg Lys Asp Val Val Asp	
190 195 200	
gaa aaa caa cca tgg gta tat cta aac tgc ggc cat gta cat ggc tat	1097
Glu Lys Gln Pro Trp Val Tyr Leu Asn Cys Gly His Val His Gly Tyr	
205 210 215	
cat aac tgg gga aac aaa gaa gaa cgt gat gga aaa gat cgt gaa tgt	1145
His Asn Trp Gly Asn Lys Glu Glu Arg Asp Gly Lys Asp Arg Glu Cys	
220 225 230 235	

cct atg tgt agg tct gtt ggt ccc tat gtt cct ctg tgg ctt gga tgt 1193  
 Pro Met Cys Arg Ser Val Gly Pro Tyr Val Pro Leu Trp Leu Gly Cys  
 240 245 250

gaa gct gga ttt tat gtg gac gcc ggc cct cca acc cat gcg ttt agc 1241  
 Glu Ala Gly Phe Tyr Val Asp Ala Gly Pro Pro Thr His Ala Phe Ser  
 255 260 265

ccg tgt ggg cat gtg tgt tca gaa aag aca act gcc tat tgg tcc cag 1289  
 Pro Cys Gly His Val Cys Ser Glu Lys Thr Thr Ala Tyr Trp Ser Gln  
 270 275 280

atc cca ctt cct cat ggt act cat act ttt cat gca gcc tgt ccc ttt 1337  
 Ile Pro Leu Pro His Gly Thr His Thr Phe His Ala Ala Cys Pro Phe  
 285 290 295

tgt gca cat cag ttg gct ggt gaa caa ggc tac atc aga ctt att ttt 1385  
 Cys Ala His Gln Leu Ala Gly Glu Gln Gly Tyr Ile Arg Leu Ile Phe  
 300 305 310 315

caa gga cct cta gac taacagacca ttgtcttgca ggactacatt ataaatttat 1440  
 Gln Gly Pro Leu Asp  
 320

aagctaagtg agttggggtt tcgaacctgt tgtccacgtc acagtttttc tgctctggtc 1500

atttgcatta agatgaagaa ttttttaaaa catttataat aaatagtagc aatttctgag 1560

caaaaatctg ggaaactcaa gcaaaggaat ttctgaaagt atcagtcttc tgaattctga 1620

gttttgaaaa tatattttga ggagaaaaag acatagtcta atttgatgcc ttccttttag 1680

tgtttttgaa tcacctatcc tcagtgtga aattgttttg tataactgag ggtactgttg 1740

gttcaaacta tgttagttta cagtttggtg caaacattgt aaaatacagc gacatgtata 1800

ttaacttttt tctatttatc tttattatag aaaatacctt agaatgttct tgatagagta 1860

gcatggtaac gatggtgtca cacccttggg gtgaatggta gcttagtgag caacctagct 1920

caaggatttg caaagttagg aagaaggacg agagagcctc tctccccacc ccaatctaaa 1980

tatggaattt ggtaaattag aatactttgt aatttgtaag accaaattca tactaattac 2040

ccgcgtgaaa ggtgtttgtt tttaacaaca ttgaagataa tcaggaaaga ttttttctta 2100

atgtttctct cgagcgtagt actataacaa aaacttaatg ctaagaaaca ttttatatgc 2160

tcctttggat atgcaattta atctagatta tctatttttc tcccatgata actaatctgt 2220  
 ttttagtatac agcagcattt ggcaagttaa ttttttggat ataaactgtg gttcatctgt 2280  
 tcaactgtttc tagaaaaaaa tcattgccat aagaaaaagt ataaattagc aagaaaggag 2340  
 agtgacttga tttgcttttg gaaaaagaaa tgcttaatta attattctgt atttggcctt 2400  
 attcggggcat taggaaatct agagatctaa agggttgaat gacaatagt cccccgtttt 2460  
 tagcagacca gccttaactc tgggtttgaa tctaaggag attgccacag tgagacttaa 2520  
 ggaaatgttt ggttggcaga tgagcaccaa tgactgcagc gtggagtgc gactgcatg 2580  
 gtctgtttat tctctaattc caatatgtct tttgcttcca gaagcaagaa aagtttcttc 2640  
 tctccctcc ttcccacct tttttcaaag gcaccacaag tatagacagt tgcactacat 2700  
 caaatctttt ttgacactt gtagaaacca gtacactttt agattagaca gtatcttctt 2760  
 ttaatatattt gatttgttt cctttagttt gaaaagtgtg ataatactta actgactgta 2820  
 gcaaagtttt atatgtggta gcataccttt aatttatcct attacaaaac tgttctgaat 2880  
 tttcttttgg tttttaaaaa acaaaacttg ttgcttagaa gccatgaatt attttatttt 2940  
 acttcaactg tcgaaacttc cttgttttaa aaaatgatca tttgggttca ctcaggaaat 3000  
 gcatgtcagg aaacttgtat tataagttaa ttagttgtga tgtatcagta actgctgtta 3060  
 cccctttttc aaagaaatgt aattgatttt gaagttttct agattgtcac atgctttgtg 3120  
 actaatgcaa gaaagcaagt cctgtgttgt atttgttcta gtcattttta ttcaggctat 3180  
 atattgtagc ttaattttta tttgcaatta atttatttta actaagtaaa tacttttcaa 3240  
 aatacataat tgaa 3254

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 320

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

Met Phe Gln Ile Gly Arg Ser Thr Glu Ser Pro Ile Asp Phe Val Val

1

5

10

15

Thr Asp Thr Val Pro Gly Ser Gln Ser Asn Ser Asp Thr Gln Ser Val  
 20 25 30

Gln Ser Thr Ile Ser Arg Phe Ala Cys Arg Ile Ile Cys Glu Arg Asn  
 35 40 45

Pro Pro Phe Thr Ala Arg Ile Tyr Ala Ala Gly Phe Asp Ser Ser Lys  
 50 55 60

Asn Ile Phe Leu Gly Glu Lys Ala Ala Lys Trp Lys Thr Ser Asp Gly  
 65 70 75 80

Gln Met Asp Gly Leu Thr Thr Asn Gly Val Leu Val Met His Pro Arg  
 85 90 95

Asn Gly Phe Thr Glu Asp Ser Lys Pro Gly Ile Trp Arg Glu Ile Ser  
 100 105 110

Val Cys Gly Asn Val Phe Ser Leu Arg Glu Thr Arg Ser Ala Gln Gln  
 115 120 125

Arg Gly Lys Met Val Glu Ile Glu Thr Asn Gln Leu Gln Asp Gly Ser  
 130 135 140

Leu Ile Asp Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp Arg Thr Ala Glu Gly  
 145 150 155 160

Leu Ser His Thr Pro Thr Val Lys His Leu Glu Ala Leu Arg Gln Glu  
 165 170 175

Ile Asn Ala Ala Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Phe Asn Thr Leu Ala  
 180 185 190

Phe Pro Ser Met Lys Arg Lys Asp Val Val Asp Glu Lys Gln Pro Trp  
 195 200 205

Val Tyr Leu Asn Cys Gly His Val His Gly Tyr His Asn Trp Gly Asn  
 210 215 220

Lys Glu Glu Arg Asp Gly Lys Asp Arg Glu Cys Pro Met Cys Arg Ser  
 225 230 235 240

Val Gly Pro Tyr Val Pro Leu Trp Leu Gly Cys Glu Ala Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Val Asp Ala Gly Pro Pro Thr His Ala Phe Ser Pro Cys Gly His Val  
 260 265 270

Cys Ser Glu Lys Thr Thr Ala Tyr Trp Ser Gln Ile Pro Leu Pro His  
 275 280 285

Gly Thr His Thr Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Ala His Gln Leu  
 290 295 300

Ala Gly Glu Gln Gly Tyr Ile Arg Leu Ile Phe Gln Gly Pro Leu Asp  
 305 310 315 320

<210> 7

<211> 3526

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (408)..(1661)

<223> codierender Bereich der M30 cDNA Variante C des  
 Menschen

<400> 7

tgaggtcctt tacttagtct gccttctctc cacttttcac agtcttctca tgttttgtat 60  
 ataatgtcca gggctcttag ttatacttag cagaaataaa agggaaaagt atgtctgctc 120  
 tatgcttctg taagtggaag tcttcaaatt tgcatttttg attcctttaa acagttttgt 180  
 aaaatatata atcattattg ggcaaaatgt ccataaaaat gtatatacct tgtgatgggt 240  
 tgcataatat tgtgttcaag aggactgctg aaaaataaca tctttattta aactgaaacg 300  
 aattgttcac attattaatg aaaacttttc ccctctagga aataatgcaa aagggtgtccc 360  
 aaggctcctg accagtgaac aaagatttga gaaagacagc caagctc atg ttt tct 416  
 Met Phe Ser  
 1

cct gat caa gaa aat cat cca tct aaa gca cca gta aaa tat ggt gaa 464  
 Pro Asp Gln Glu Asn His Pro Ser Lys Ala Pro Val Lys Tyr Gly Glu  
 5 10 15

ctc att gtc tta ggg tat aat ggg tct ctc cca aat ggc gat aga gga 512  
 Leu Ile Val Leu Gly Tyr Asn Gly Ser Leu Pro Asn Gly Asp Arg Gly  
 20 25 30 35

agg agg aaa agt agg ttt gct ttg ttt aaa aga cct aag gca aat ggg	560
Arg Arg Lys Ser Arg Phe Ala Leu Phe Lys Arg Pro Lys Ala Asn Gly	
40 45 50	
gtg aag ccc agc act gtg cat att gct tgt act cct cag gct gca aag	608
Val Lys Pro Ser Thr Val His Ile Ala Cys Thr Pro Gln Ala Ala Lys	
55 60 65	
gca ata agc aac aaa gac cag cat agc ata tca tat act ttg tct cgg	656
Ala Ile Ser Asn Lys Asp Gln His Ser Ile Ser Tyr Thr Leu Ser Arg	
70 75 80	
gcc cag act gtg gtg gtt gaa tat act cat gac agc aac aca gat atg	704
Ala Gln Thr Val Val Val Glu Tyr Thr His Asp Ser Asn Thr Asp Met	
85 90 95	
ttt cag att ggc cgg tcg act gaa agc ccc att gat ttt gta gta act	752
Phe Gln Ile Gly Arg Ser Thr Glu Ser Pro Ile Asp Phe Val Val Thr	
100 105 110 115	
gac acg gtt cct gga agt caa agt aat tct gat aca cag tca gta caa	800
Asp Thr Val Pro Gly Ser Gln Ser Asn Ser Asp Thr Gln Ser Val Gln	
120 125 130	
agc act ata tca aga ttt gcc tgc aga atc ata tgt gaa cgg aat cct	848
Ser Thr Ile Ser Arg Phe Ala Cys Arg Ile Ile Cys Glu Arg Asn Pro	
135 140 145	
ccc ttt aca gca cgg att tat gct gca gga ttt gac tca tca aaa aac	896
Pro Phe Thr Ala Arg Ile Tyr Ala Ala Gly Phe Asp Ser Ser Lys Asn	
150 155 160	
atc ttt ctt ggg gag aag gct gcc aaa tgg aag aca tca gat gga cag	944
Ile Phe Leu Gly Glu Lys Ala Ala Lys Trp Lys Thr Ser Asp Gly Gln	
165 170 175	
atg gat ggc ttg acc act aat ggt gtt ctt gtg atg cat cca cgc aat	992
Met Asp Gly Leu Thr Thr Asn Gly Val Leu Val Met His Pro Arg Asn	
180 185 190 195	
ggg ttc aca gaa gac tcc aag cct gga ata tgg aga gaa ata tcg gtg	1040
Gly Phe Thr Glu Asp Ser Lys Pro Gly Ile Trp Arg Glu Ile Ser Val	
200 205 210	
tgt gga aat gta ttt agc cta cgt gaa acc aga tcg gct cag cag aga	1088
Cys Gly Asn Val Phe Ser Leu Arg Glu Thr Arg Ser Ala Gln Gln Arg	
215 220 225	



gga aaa atg gtg gaa att gaa acc aat cag tta caa gat ggc tcg tta	1136
Gly Lys Met Val Glu Ile Glu Thr Asn Gln Leu Gln Asp Gly Ser Leu	
230 235 240	
att gac ctc tgt ggt gca aca ttg tta tgg cgt act gca gaa ggc ctt	1184
Ile Asp Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp Arg Thr Ala Glu Gly Leu	
245 250 255	
tcc cac act cct acc gtg aag cat tta gaa gct tta aga cag gaa atc	1232
Ser His Thr Pro Thr Val Lys His Leu Glu Ala Leu Arg Gln Glu Ile	
260 265 270 275	
aat gca gca cga cct cag tgc cct gta ggg ttc aac aca cta gca ttt	1280
Asn Ala Ala Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Phe Asn Thr Leu Ala Phe	
280 285 290	
cct agt atg aag agg aaa gac gtt gta gat gaa aaa caa cca tgg gta	1328
Pro Ser Met Lys Arg Lys Asp Val Val Asp Glu Lys Gln Pro Trp Val	
295 300 305	
tat cta aac tgc ggc cat gta cat ggc tat cat aac tgg gga aac aaa	1376
Tyr Leu Asn Cys Gly His Val His Gly Tyr His Asn Trp Gly Asn Lys	
310 315 320	
gaa gaa cgt gat gga aaa gat cgt gaa tgt cct atg tgt agg tct gtt	1424
Glu Glu Arg Asp Gly Lys Asp Arg Glu Cys Pro Met Cys Arg Ser Val	
325 330 335	
ggt ccc tat gtt cct ctg tgg ctt gga tgt gaa gct gga ttt tat gtg	1472
Gly Pro Tyr Val Pro Leu Trp Leu Gly Cys Glu Ala Gly Phe Tyr Val	
340 345 350 355	
gac gcc ggc cct cca acc cat gcg ttt agc ccg tgt ggg cat gtg tgt	1520
Asp Ala Gly Pro Pro Thr His Ala Phe Ser Pro Cys Gly His Val Cys	
360 365 370	
tca gaa aag aca act gcc tat tgg tcc cag atc cca ctt cct cat ggt	1568
Ser Glu Lys Thr Thr Ala Tyr Trp Ser Gln Ile Pro Leu Pro His Gly	
375 380 385	
act cat act ttt cat gca gcc tgt ccc ttt tgt gca cat cag ttg gct	1616
Thr His Thr Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Ala His Gln Leu Ala	
390 395 400	
ggt gaa caa ggc tac atc aga ctt att ttt caa gga cct cta gac	1661
Gly Glu Gln Gly Tyr Ile Arg Leu Ile Phe Gln Gly Pro Leu Asp	
405 410 415	

taacagacca ttgtcttgca ggactacatt ataaatttat aagctaagtg agttgggttt 1721  
tcgaacctgt tgtccacgtc acagtttttc tgctctggtc atttgcatta agatgaagaa 1781  
ttttttaaaa catttataat aaatagtagc aatttctgag caaaaatctg ggaaactcaa 1841  
gcaaaggaat ttctgaaagt atcagtcttc tgaattctga gttttgaaaa tatattttga 1901  
ggagaaaaag acatagtcta atttgatgcc ttccttttag tgtttttgaa tcacctatcc 1961  
tcagtgtctga aattgttttg tataactgag ggtactgttg gttcaaacta tgtagttta 2021  
cagtttggtg caaacattgt aaaatacagc gacatgtata ttaacttttt tctatttattc 2081  
tttattatag aaaatacctt agaatgttct tgatagagta gcctggtaac gatgggtgtca 2141  
cacccttggt gtgaatggta gcttagtgag caacctagct caaggatttg caaagttagg 2201  
aagaaggacg agagagcctc tctccccacc ccaatctaaa tatggaattt ggtaaattag 2261  
aatactttgt aatttgtaag accaaattca tactaattac ccgctgaaa ggtgtttggt 2321  
tttaacaaca ttgaagataa tcaggaaaga tttttctta atgtttctct cgagcgtagt 2381  
actataacaa aaacttaatg ctaagaaaca ttttatatgc tcctttggat atgcaattta 2441  
atctagatta tctatttttc tcccatgata actaatctgt ttttagtattc agcagcattt 2501  
ggcaagttaa ttttttgat ataaactgtg gttcatctgt tcaactgttc tagaaaaaaa 2561  
tcattgccat aagaaaaagt ataaattagc aagaaaggag agtgacttga tttgcttttg 2621  
gaaaaagaaa tgcttaatta attattctgt atttggcctt attcgggcat taggaaatct 2681  
agagatctaa agggttgaat gacaatagtg cccccgttt tagcagacca gccttaactc 2741  
tggttttgaa tcctaaggag attgccacag tgagacttaa ggaaatgttt ggttggcaga 2801  
tgagcaccaa tgactgcagc gtggagtgc gcaactgcag gtctgtttat tctctaattc 2861  
caatatgtct tttgcttcca gaagcaagaa aagtttcttc tctccctcc tccccacct 2921  
ttttcaaag gcaccacaag tatagacagt tgcactacat caaatctttt tttgacactt 2981  
gtagaaacca gtacactttt agattagaca gtatcttctt ttaatatttt gatttgtttt 3041  
cctttagttt gaaaagttgt ataacttta actgactgta gcaaagtttt atatgtggta 3101

gcataccttt aatttatcct attacaaaac tgttctgaat tttcttttgg tttttaaaaa 3161  
 aaaaaacttg ttgcttagaa gccatgaatt attttatattt acttcaactg tcgaaacttc 3221  
 cttgttttaa aaaatgatca tttgggttca ctcaggaaat gcatgtcagg aaacttgtat 3281  
 tataagttaa ttagttgtga tgtatcagta actgctgtta cccctttttc aaagaaatgt 3341  
 aattgatttt gaagttttct agattgtcac atgctttgtg actaatgcaa gaaagcaagt 3401  
 cctgtgttgt atttgttcta gtcattttta ttcaggctat atattgtagc ttaattttta 3461  
 tttgcaatta atttatttaa actaagtaaa tactttttcaa aatacataat tgaaaaaaaa 3521  
 aaaaaa 3526

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 418

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

Met Phe Ser Pro Asp Gln Glu Asn His Pro Ser Lys Ala Pro Val Lys  
 1 5 10 15

Tyr Gly Glu Leu Ile Val Leu Gly Tyr Asn Gly Ser Leu Pro Asn Gly  
 20 25 30

Asp Arg Gly Arg Arg Lys Ser Arg Phe Ala Leu Phe Lys Arg Pro Lys  
 35 40 45

Ala Asn Gly Val Lys Pro Ser Thr Val His Ile Ala Cys Thr Pro Gln  
 50 55 60

Ala Ala Lys Ala Ile Ser Asn Lys Asp Gln His Ser Ile Ser Tyr Thr  
 65 70 75 80

Leu Ser Arg Ala Gln Thr Val Val Val Glu Tyr Thr His Asp Ser Asn  
 85 90 95

Thr Asp Met Phe Gln Ile Gly Arg Ser Thr Glu Ser Pro Ile Asp Phe  
 100 105 110

Val Val Thr Asp Thr Val Pro Gly Ser Gln Ser Asn Ser Asp Thr Gln  
 115 120 125

Ser Val Gln Ser Thr Ile Ser Arg Phe Ala Cys Arg Ile Ile Cys Glu

130	135	140
Arg Asn Pro Pro Phe Thr Ala Arg Ile Tyr Ala Ala Gly Phe Asp Ser		
145	150	155 160
Ser Lys Asn Ile Phe Leu Gly Glu Lys Ala Ala Lys Trp Lys Thr Ser		
	165	170 175
Asp Gly Gln Met Asp Gly Leu Thr Thr Asn Gly Val Leu Val Met His		
	180	185 190
Pro Arg Asn Gly Phe Thr Glu Asp Ser Lys Pro Gly Ile Trp Arg Glu		
	195	200 205
Ile Ser Val Cys Gly Asn Val Phe Ser Leu Arg Glu Thr Arg Ser Ala		
	210	215 220
Gln Gln Arg Gly Lys Met Val Glu Ile Glu Thr Asn Gln Leu Gln Asp		
	225	230 235 240
Gly Ser Leu Ile Asp Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp Arg Thr Ala		
	245	250 255
Glu Gly Leu Ser His Thr Pro Thr Val Lys His Leu Glu Ala Leu Arg		
	260	265 270
Gln Glu Ile Asn Ala Ala Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Phe Asn Thr		
	275	280 285
Leu Ala Phe Pro Ser Met Lys Arg Lys Asp Val Val Asp Glu Lys Gln		
	290	295 300
Pro Trp Val Tyr Leu Asn Cys Gly His Val His Gly Tyr His Asn Trp		
	305	310 315 320
Gly Asn Lys Glu Glu Arg Asp Gly Lys Asp Arg Glu Cys Pro Met Cys		
	325	330 335
Arg Ser Val Gly Pro Tyr Val Pro Leu Trp Leu Gly Cys Glu Ala Gly		
	340	345 350
Phe Tyr Val Asp Ala Gly Pro Pro Thr His Ala Phe Ser Pro Cys Gly		
	355	360 365
His Val Cys Ser Glu Lys Thr Thr Ala Tyr Trp Ser Gln Ile Pro Leu		
	370	375 380
Pro His Gly Thr His Thr Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Ala His		

385                      390                      395                      400

Gln Leu Ala Gly Glu Gln Gly Tyr Ile Arg Leu Ile Phe Gln Gly Pro

                    405                      410                      . 415

Leu Asp

<210> 9

<211> 3222

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (104)..(1357)

<223> codierender Bereich der M30 cDNA Varianre D des  
Menschen

<400> 9

ccgctctggg atcccggcca ccagcaattg tccggaaata atgcaaaagg tgtcccaagg 60

ctcctgacca gtgaacaaaag atttgagaaa gacagccaag ctc atg ttt tct cct 115  
Met Phe Ser Pro  
1

gat caa gaa aat cat cca tct aaa gca cca gta aaa tat ggt gaa ctc 163  
Asp Gln Glu Asn His Pro Ser Lys Ala Pro Val Lys Tyr Gly Glu Leu  
5                      10                      15                      20

att gtc tta ggg tat aat ggg tct ctc cca aat ggc gat aga gga agg 211  
Ile Val Leu Gly Tyr Asn Gly Ser Leu Pro Asn Gly Asp Arg Gly Arg  
25                      30                      35

agg aaa agt agg ttt gct ttg ttt aaa aga cct aag gca aat ggg gtg 259  
Arg Lys Ser Arg Phe Ala Leu Phe Lys Arg Pro Lys Ala Asn Gly Val  
40                      45                      50

aag ccc agc act gtg cat att gct tgt act cct cag gct gca aag gca 307  
Lys Pro Ser Thr Val His Ile Ala Cys Thr Pro Gln Ala Ala Lys Ala  
55                      60                      65

ata agc aac aaa gac cag cat agc ata tca tat act ttg tct cgg gcc 355  
Ile Ser Asn Lys Asp Gln His Ser Ile Ser Tyr Thr Leu Ser Arg Ala  
70                      75                      80

cag act gtg gtg gtt gaa tat act cat gac agc aac aca gat atg ttt	403
Gln Thr Val Val Val Glu Tyr Thr His Asp Ser Asn Thr Asp Met Phe	
85 90 95 100	
cag att ggc cgg tcg act gaa agc ccc att gat ttt gta gta act gac	451
Gln Ile Gly Arg Ser Thr Glu Ser Pro Ile Asp Phe Val Val Thr Asp	
105 110 115	
acg gtt cct gga agt caa agt aat tct gat aca cag tca gta caa agc	499
Thr Val Pro Gly Ser Gln Ser Asn Ser Asp Thr Gln Ser Val Gln Ser	
120 125 130	
act ata tca aga ttt gcc tgc aga atc ata tgt gaa cgg aat cct ccc	547
Thr Ile Ser Arg Phe Ala Cys Arg Ile Ile Cys Glu Arg Asn Pro Pro	
135 140 145	
ttt aca gca cgg att tat gct gca gga ttt gac tca tca aaa aac atc	595
Phe Thr Ala Arg Ile Tyr Ala Ala Gly Phe Asp Ser Ser Lys Asn Ile	
150 155 160	
ttt ctt ggg gag aag gct gcc aaa tgg aag aca tca gat gga cag atg	643
Phe Leu Gly Glu Lys Ala Ala Lys Trp Lys Thr Ser Asp Gly Gln Met	
165 170 175 180	
gat ggc ttg acc act aat ggt gtt ctt gtg atg cat cca cgc aat ggg	691
Asp Gly Leu Thr Thr Asn Gly Val Leu Val Met His Pro Arg Asn Gly	
185 190 195	
ttc aca gaa gac tcc aag cct gga ata tgg aga gaa ata tcg gtg tgt	739
Phe Thr Glu Asp Ser Lys Pro Gly Ile Trp Arg Glu Ile Ser Val Cys	
200 205 210	
gga aat gta ttt agc cta cgt gaa acc aga tcg gct cag cag aga gga	787
Gly Asn Val Phe Ser Leu Arg Glu Thr Arg Ser Ala Gln Gln Arg Gly	
215 220 225	
aaa atg gtg gaa att gaa acc aat cag tta caa gat ggc tcg tta att	835
Lys Met Val Glu Ile Glu Thr Asn Gln Leu Gln Asp Gly Ser Leu Ile	
230 235 240	
gac ctc tgt ggt gca aca ttg tta tgg cgt act gca gaa ggc ctt tcc	883
Asp Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp Arg Thr Ala Glu Gly Leu Ser	
245 250 255 260	
cac act cct acc gtg aag cat tta gaa gct tta aga cag gaa atc aat	931
His Thr Pro Thr Val Lys His Leu Glu Ala Leu Arg Gln Glu Ile Asn	
265 270 275	

gca gca cga cct cag tgc cct gta ggg ttc aac aca cta gca ttt cct 979  
 Ala Ala Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Phe Asn Thr Leu Ala Phe Pro  
 280 285 290

agt atg aag agg aaa gac gtt gta gat gaa aaa caa cca tgg gta tat 1027  
 Ser Met Lys Arg Lys Asp Val Val Asp Glu Lys Gln Pro Trp Val Tyr  
 295 300 305

cta aac tgc ggc cat gta cat ggc tat cat aac tgg gga aac aaa gaa 1075  
 Leu Asn Cys Gly His Val His Gly Tyr His Asn Trp Gly Asn Lys Glu  
 310 315 320

gaa cgt gat gga aaa gat cgt gaa tgt cct atg tgt agg tct gtt ggt 1123  
 Glu Arg Asp Gly Lys Asp Arg Glu Cys Pro Met Cys Arg Ser Val Gly  
 325 330 335 340

ccc tat gtt cct ctg tgg ctt gga tgt gaa gct gga ttt tat gtg gac 1171  
 Pro Tyr Val Pro Leu Trp Leu Gly Cys Glu Ala Gly Phe Tyr Val Asp  
 345 350 355

gcc ggc cct cca acc cat gcg ttt agc ccg tgt ggg cat gtg tgt tca 1219  
 Ala Gly Pro Pro Thr His Ala Phe Ser Pro Cys Gly His Val Cys Ser  
 360 365 370

gaa aag aca act gcc tat tgg tcc cag atc cca ctt cct cat ggt act 1267  
 Glu Lys Thr Thr Ala Tyr Trp Ser Gln Ile Pro Leu Pro His Gly Thr  
 375 380 385

cat act ttt cat gca gcc tgt ccc ttt tgt gca cat cag ttg gct ggt 1315  
 His Thr Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Ala His Gln Leu Ala Gly  
 390 395 400

gaa caa ggc tac atc aga ctt att ttt caa gga cct cta gac 1357  
 Glu Gln Gly Tyr Ile Arg Leu Ile Phe Gln Gly Pro Leu Asp  
 405 410 415

taacagaccâ ttgtcttgca ggactacatt ataaatttat aagctaagtg agttggggtt 1417

tcgaacctgt tgtccacgtc acagtttttc tgctctgggtc atttgcatta agatgaagaa 1477

ttttttaaaa catttataat aaatagtagc aattttctgag caaaaatctg ggaaactcaa 1537

gcaaaggaat ttctgaaagt atcagtccttc tgaattctga gttttgaaaa tatattttga 1597

ggagaaaaag acatagtcta atttgatgcc ttcccttttag tgtttttgaa tcacctatcc 1657

tcagtgctga aattgttttg tataactgag ggtactgttg gttcaaacta tgttagttta 1717

cagtttggtg caaacattgt aaaatacagc gacatgtata ttaacttttt tctatttata 1777  
tttattatag aaaatacctt agaatgttct tgatagagta gcatggtaac gatgggtgtca 1837  
cacccttggt gtgaatggta gcttagtgag caacctagct caaggatttg caaagttagg 1897  
aagaaggacg agagagcctc tctccccacc ccaatctaaa tatggaattt ggtaaattag 1957  
aatactttgt aatttgtaag accaaattca tactaattac ccgcgtgaaa ggtgtttgtt 2017  
tttaacaaca ttgaagataa tcaggaaaga ttttttctta atgtttctct cgagcgtagt 2077  
actataacaa aaacttaatg ctaagaaaca ttttatatgc tcctttggat atgcaattta 2137  
atctagatta tctatttttc tcccatgata actaatctgt ttttagtata agcagcattt 2197  
ggcaagttaa ttttttggat ataaactgtg gttcatctgt tcaactgttc tagaaaaaa 2257  
tcattgccat aagaaaaagt ataaattagc aagaaaggag agtgacttga tttgcttttg 2317  
gaaaaagaaa tgcttaatta attattctgt atttggcctt attcgggcat taggaaatct 2377  
agagatctaa agggttgaat gacaatagtg cccccgtttt tagcagacca gccttaactc 2437  
tgggtttgaa tcctaaggag attgccacag tgagacttaa ggaaatgttt ggttggcaga 2497  
tgagaccaa tgactgcagc gtggagtgc gactgcatg gtctgtttat tctctaattc 2557  
caatatgtct tttgcttcca gaagcaagaa aagtttcttc tctccccctc tccccaccct 2617  
tttttcaaag gcaccacaag tatagacagt tgcaactacat caaatctttt tttgacactt 2677  
gtagaaacca gtacactttt agattagaca gtatcttctt ttaatatttt gatttgtttt 2737  
cctttagttt gaaaagttgt ataacttta actgactgta gcaaagtttt atatgtggta 2797  
gcataccttt aatttatcct attacaaaac tgttctgaat tttcttttgg tttttaaaaa 2857  
acaaaacttg ttgcttagaa gccatgaatt attttatttt acttcaactg tcgaaacttc 2917  
cttgttttta aaaatgatca tttgggttca ctcaggaaat gcatgtcagg aaacttgat 2977  
tataagttta ttagttgtga tgtatcagta actgctgtta ccccttttcc aaagaaatgt 3037  
aattgatttt gaagttttct agattgtcac atgctttgtg actaatgcaa gaaagcaagt 3097  
cctgtgttgt atttgttcta gtcattttta ttcaggctat atattgtagc ttaattttta 3157



tttgcaatta atttatttaa actaagtaaa tacttttcaa aatacataat tgaaaaaaaa 3217

aaaaa

3222

<210> 10

<211> 418

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Phe Ser Pro Asp Gln Glu Asn His Pro Ser Lys Ala Pro Val Lys  
1 5 10 15

Tyr Gly Glu Leu Ile Val Leu Gly Tyr Asn Gly Ser Leu Pro Asn Gly  
20 25 30

Asp Arg Gly Arg Arg Lys Ser Arg Phe Ala Leu Phe Lys Arg Pro Lys  
35 40 45

Ala Asn Gly Val Lys Pro Ser Thr Val His Ile Ala Cys Thr Pro Gln  
50 55 60

Ala Ala Lys Ala Ile Ser Asn Lys Asp Gln His Ser Ile Ser Tyr Thr  
65 70 75 80

Leu Ser Arg Ala Gln Thr Val Val Val Glu Tyr Thr His Asp Ser Asn  
85 90 95

Thr Asp Met Phe Gln Ile Gly Arg Ser Thr Glu Ser Pro Ile Asp Phe  
100 105 110

Val Val Thr Asp Thr Val Pro Gly Ser Gln Ser Asn Ser Asp Thr Gln  
115 120 125

Ser Val Gln Ser Thr Ile Ser Arg Phe Ala Cys Arg Ile Ile Cys Glu  
130 135 140

Arg Asn Pro Pro Phe Thr Ala Arg Ile Tyr Ala Ala Gly Phe Asp Ser  
145 150 155 160

Ser Lys Asn Ile Phe Leu Gly Glu Lys Ala Ala Lys Trp Lys Thr Ser  
165 170 175

Asp Gly Gln Met Asp Gly Leu Thr Thr Asn Gly Val Leu Val Met His  
180 185 190

Pro Arg Asn Gly Phe Thr Glu Asp Ser Lys Pro Gly Ile Trp Arg Glu

195	200	205
Ile Ser Val Cys Gly Asn Val Phe Ser Leu Arg Glu Thr Arg Ser Ala		
210	215	220
Gln Gln Arg Gly Lys Met Val Glu Ile Glu Thr Asn Gln Leu Gln Asp		
225	230	235 240
Gly Ser Leu Ile Asp Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp Arg Thr Ala		
245	250	255
Glu Gly Leu Ser His Thr Pro Thr Val Lys His Leu Glu Ala Leu Arg		
260	265	270
Gln Glu Ile Asn Ala Ala Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Phe Asn Thr		
275	280	285
Leu Ala Phe Pro Ser Met Lys Arg Lys Asp Val Val Asp Glu Lys Gln		
290	295	300
Pro Trp Val Tyr Leu Asn Cys Gly His Val His Gly Tyr His Asn Trp		
305	310	315 320
Gly Asn Lys Glu Glu Arg Asp Gly Lys Asp Arg Glu Cys Pro Met Cys		
325	330	335
Arg Ser Val Gly Pro Tyr Val Pro Leu Trp Leu Gly Cys Glu Ala Gly		
340	345	350
Phe Tyr Val Asp Ala Gly Pro Pro Thr His Ala Phe Ser Pro Cys Gly		
355	360	365
His Val Cys Ser Glu Lys Thr Thr Ala Tyr Trp Ser Gln Ile Pro Leu		
370	375	380
Pro His Gly Thr His Thr Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Ala His		
385	390	395 400
Gln Leu Ala Gly Glu Gln Gly Tyr Ile Arg Leu Ile Phe Gln Gly Pro		
405	410	415
Leu Asp		

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 1936

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (142)..(1476)

&lt;223&gt; codierender Bereich der M31 cDNA der Maus

&lt;400&gt; 11

```

ccgggcctcg ggtgtccccg tgacgaggct gcaccgagca gccgcgggcc gggcccatcc 60

cgccgcggca gtcccggggc gcagtagagg tgaggcgggt gggggccagc agcacacaga 120

gagccccaga acgccgccag a atg gtg ctg gaa gga aac cct gac gtg gga 171
                        Met Val Leu Glu Gly Asn Pro Asp Val Gly
                          1             5             10

tcc ccc cgg acc tca gac ctc cag cac ccg ggg agc cag ggc tct tgc 219
Ser Pro Arg Thr Ser Asp Leu Gln His Pro Gly Ser Gln Gly Ser Cys
                        15             20             25

atc ctg tct tgt cct ggt gaa gaa gca ctg gca ggc gag gag ccc atc 267
Ile Leu Ser Cys Pro Gly Glu Glu Ala Leu Ala Gly Glu Glu Pro Ile
                        30             35             40

aag tat ggt gaa ctc atc gtt ctg ggc tac aat ggg tgt ctg gca agt 315
Lys Tyr Gly Glu Leu Ile Val Leu Gly Tyr Asn Gly Cys Leu Ala Ser
                        45             50             55

gga gac aag ggc cgc cgc cga agc cgc ctg gca ctg agc cgc cgg cca 363
Gly Asp Lys Gly Arg Arg Arg Ser Arg Leu Ala Leu Ser Arg Arg Pro
                        60             65             70

cat gcc aac gga gtg aag cca gat gtc atg cac cac atc tcc aca cca 411
His Ala Asn Gly Val Lys Pro Asp Val Met His His Ile Ser Thr Pro
                        75             80             85             90

ctc gtc tcc aag gcc ctg agt aac cga ggc cag cac agc atc tca ttc 459
Leu Val Ser Lys Ala Leu Ser Asn Arg Gly Gln His Ser Ile Ser Phe
                        95             100             105

aca ctg tcc cgg agt cac tca gtc ata gtg gag tac aca cat gac agc 507
Thr Leu Ser Arg Ser His Ser Val Ile Val Glu Tyr Thr His Asp Ser
                        110             115             120

gac aaa gac atg ttc cag att ggc cgc tct act gaa aac atg att gac 555
Asp Lys Asp Met Phe Gln Ile Gly Arg Ser Thr Glu Asn Met Ile Asp
                        125             130             135

```

ttt gtg gta aca gac aca tct cct ggt gga ggg gct aca gag ggc cct	603
Phe Val Val Thr Asp Thr Ser Pro Gly Gly Gly Ala Thr Glu Gly Pro	
140 145 150	
tct gcc caa agt acc atc tcc cgc tat gcc tgc aga att ctc tgt gac	651
Ser Ala Gln Ser Thr Ile Ser Arg Tyr Ala Cys Arg Ile Leu Cys Asp	
155 160 165 170	
cgc cgg cca ccc tat act gcc cga atc tac gct gct ggc ttt gat gcc	699
Arg Arg Pro Pro Tyr Thr Ala Arg Ile Tyr Ala Ala Gly Phe Asp Ala	
175 180 185	
tct agc aac atc ttt ctt gga gag cgg gca gcc aaa tgg agg act ccg	747
Ser Ser Asn Ile Phe Leu Gly Glu Arg Ala Ala Lys Trp Arg Thr Pro	
190 195 200	
gat ggt ctg atg gac ggc ttg aca acc aat ggg gtt ctg gtg atg cac	795
Asp Gly Leu Met Asp Gly Leu Thr Thr Asn Gly Val Leu Val Met His	
205 210 215	
cca gca ggt ggc ttc tcc gag gac tct gcc cca ggt gtc tgg agg gag	843
Pro Ala Gly Gly Phe Ser Glu Asp Ser Ala Pro Gly Val Trp Arg Glu	
220 225 230	
att tct gtc tgc ggg aat gtg tac acg ctg cgg gat agc cga tca gct	891
Ile Ser Val Cys Gly Asn Val Tyr Thr Leu Arg Asp Ser Arg Ser Ala	
235 240 245 250	
cag cag cgg ggg aag ctg gtg gaa aac gaa tcc aac gtc ctg caa gac	939
Gln Gln Arg Gly Lys Leu Val Glu Asn Glu Ser Asn Val Leu Gln Asp	
255 260 265	
ggt tgc ctc atc gac ctg tgt ggg gcc aca ctg ttg tgg cgc act ccg	987
Gly Ser Leu Ile Asp Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp Arg Thr Pro	
270 275 280	
gct ggg ttg ctg agg gca ccc aca ctg aaa caa cta gag gcc cag cga	1035
Ala Gly Leu Leu Arg Ala Pro Thr Leu Lys Gln Leu Glu Ala Gln Arg	
285 290 295	
cag gag gcc aac gca gca cgg ccc cag tgc ccc gtg ggc ctt agc acc	1083
Gln Glu Ala Asn Ala Ala Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Leu Ser Thr	
300 305 310	
ttg gcc ttc ccc agc cca gcc cgt ggc cgc aca gca ccc gac aaa cag	1131
Leu Ala Phe Pro Ser Pro Ala Arg Gly Arg Thr Ala Pro Asp Lys Gln	
315 320 325 330	

caa ccc tgg gtc tac gtc cgt tgt ggt cat gtc cat ggc tat cac ggc 1179  
 Gln Pro Trp Val Tyr Val Arg Cys Gly His Val His Gly Tyr His Gly  
 335 340 345

tgg ggc tgc cgg agg gaa caa ggc ccc cag gag cga gag tgt cct ctc 1227  
 Trp Gly Cys Arg Arg Glu Gln Gly Pro Gln Glu Arg Glu Cys Pro Leu  
 350 355 360

tgc cgc ctt gtg gga ccc tat gtg ccc ctg tgg ctc ggt cag gag gcc 1275  
 Cys Arg Leu Val Gly Pro Tyr Val Pro Leu Trp Leu Gly Gln Glu Ala  
 365 370 375

ggt ctc tgc ctg gac cct ggg cca ccc agc cac gct ttt gca ccc tgt 1323  
 Gly Leu Cys Leu Asp Pro Gly Pro Pro Ser His Ala Phe Ala Pro Cys  
 380 385 390

ggc cac gtc tgt tct gag aag act gcc cgc tac tgg gct cag aca ccg 1371  
 Gly His Val Cys Ser Glu Lys Thr Ala Arg Tyr Trp Ala Gln Thr Pro  
 395 400 405 410

ctg ccg cac ggc acc cat gct ttc cac gct gcc tgc ccc ttc tgt gga 1419  
 Leu Pro His Gly Thr His Ala Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Gly  
 415 420 425

gct tgg ctc acc ggt gag ctt ggc tgt gtc cgc ctc att ttc cag ggg 1467  
 Ala Trp Leu Thr Gly Glu Leu Gly Cys Val Arg Leu Ile Phe Gln Gly  
 430 435 440

cca ctg gac taggctctcc gggacccttg ctgccatgct cgccctgccca 1516  
 Pro Leu Asp  
 445

cccaggcccc ccattctctg ctgttcagag ggagctctgc atgtgggact ctgcctgctg 1576

gcaataacca cgccagttgg aagcattgga tgggctgtgg ccctccctc ggctctcgcc 1636

tctcagaggg tcaactgagat ctcgatccca ggcatactga tagggacttt agcaccagct 1696

ctgccccagg ctgatggagg gcaccccatg cctctgccct ccctggagta ccctacatca 1756

tgccgcatac actgtgcccc tgggggaatg aaggggcat ggccccgac ctccagctta 1816

gactggttgt gccctgaacc tgccaatgca ggaacagcta ttctccctc ctgctgctgc 1876

tgccgtgggt tactctataa accttgctgc tcagctgccc ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1936

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 445

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 12

Met Val Leu Glu Gly Asn Pro Asp Val Gly Ser Pro Arg Thr Ser Asp  
 1 5 10 15

Leu Gln His Pro Gly Ser Gln Gly Ser Cys Ile Leu Ser Cys Pro Gly  
 20 25 30

Glu Glu Ala Leu Ala Gly Glu Glu Pro Ile Lys Tyr Gly Glu Leu Ile  
 35 40 45

Val Leu Gly Tyr Asn Gly Cys Leu Ala Ser Gly Asp Lys Gly Arg Arg  
 50 55 60

Arg Ser Arg Leu Ala Leu Ser Arg Arg Pro His Ala Asn Gly Val Lys  
 65 70 75 80

Pro Asp Val Met His His Ile Ser Thr Pro Leu Val Ser Lys Ala Leu  
 85 90 95

Ser Asn Arg Gly Gln His Ser Ile Ser Phe Thr Leu Ser Arg Ser His  
 100 105 110

Ser Val Ile Val Glu Tyr Thr His Asp Ser Asp Lys Asp Met Phe Gln  
 115 120 125

Ile Gly Arg Ser Thr Glu Asn Met Ile Asp Phe Val Val Thr Asp Thr  
 130 135 140

Ser Pro Gly Gly Gly Ala Thr Glu Gly Pro Ser Ala Gln Ser Thr Ile  
 145 150 155 160

Ser Arg Tyr Ala Cys Arg Ile Leu Cys Asp Arg Arg Pro Pro Tyr Thr  
 165 170 175

Ala Arg Ile Tyr Ala Ala Gly Phe Asp Ala Ser Ser Asn Ile Phe Leu  
 180 185 190

Gly Glu Arg Ala Ala Lys Trp Arg Thr Pro Asp Gly Leu Met Asp Gly  
 195 200 205

Leu Thr Thr Asn Gly Val Leu Val Met His Pro Ala Gly Gly Phe Ser  
 210 215 220

Glu Asp Ser Ala Pro Gly Val Trp Arg Glu Ile Ser Val Cys Gly Asn  
 225 230 235 240  
 Val Tyr Thr Leu Arg Asp Ser Arg Ser Ala Gln Gln Arg Gly Lys Leu  
 245 250 255  
 Val Glu Asn Glu Ser Asn Val Leu Gln Asp Gly Ser Leu Ile Asp Leu  
 260 265 270  
 Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp Arg Thr Pro Ala Gly Leu Leu Arg Ala  
 275 280 285  
 Pro Thr Leu Lys Gln Leu Glu Ala Gln Arg Gln Glu Ala Asn Ala Ala  
 290 295 300  
 Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Leu Ser Thr Leu Ala Phe Pro Ser Pro  
 305 310 315 320  
 Ala Arg Gly Arg Thr Ala Pro Asp Lys Gln Gln Pro Trp Val Tyr Val  
 325 330 335  
 Arg Cys Gly His Val His Gly Tyr His Gly Trp Gly Cys Arg Arg Glu  
 340 345 350  
 Gln Gly Pro Gln Glu Arg Glu Cys Pro Leu Cys Arg Leu Val Gly Pro  
 355 360 365  
 Tyr Val Pro Leu Trp Leu Gly Gln Glu Ala Gly Leu Cys Leu Asp Pro  
 370 375 380  
 Gly Pro Pro Ser His Ala Phe Ala Pro Cys Gly His Val Cys Ser Glu  
 385 390 395 400  
 Lys Thr Ala Arg Tyr Trp Ala Gln Thr Pro Leu Pro His Gly Thr His  
 405 410 415  
 Ala Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Gly Ala Trp Leu Thr Gly Glu  
 420 425 430  
 Leu Gly Cys Val Arg Leu Ile Phe Gln Gly Pro Leu Asp  
 435 440 445

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 2589

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (61)..(1395)

&lt;223&gt; codierender Bereich der M31 cDNA des Menschen

&lt;300&gt;

&lt;400&gt; 13

gccgagcagg ggctaggcgg ggagggagcgg gcgcccagcgg gggcccggag cgtggccaga 60

atg	gtg	ctg	gaa	gga	aac	cct	gaa	gtg	ggg	tcc	ccc	cga	acc	tca	gac	108
Met	Val	Leu	Glu	Gly	Asn	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Pro	Arg	Thr	Ser	Asp	
1				5					10					15		

ctc	cag	cac	cgg	ggg	aac	aag	ggc	tct	tgc	gtt	ctc	tcc	tct	ccc	ggg	156
Leu	Gln	His	Arg	Gly	Asn	Lys	Gly	Ser	Cys	Val	Leu	Ser	Ser	Pro	Gly	
			20				25						30			

gaa	gat	gcg	cag	cca	ggc	gag	gag	ccc	atc	aag	tat	ggg	gaa	ctc	atc	204
Glu	Asp	Ala	Gln	Pro	Gly	Glu	Glu	Pro	Ile	Lys	Tyr	Gly	Glu	Leu	Ile	
		35					40					45				

gtc	ctg	ggc	tac	aat	ggg	tgt	ctg	gca	agt	ggg	gac	aag	ggc	cgc	cgg	252
Val	Leu	Gly	Tyr	Asn	Gly	Cys	Leu	Ala	Ser	Gly	Asp	Lys	Gly	Arg	Arg	
	50					55					60					

cga	agc	cgc	ctg	gca	ctg	agc	cgc	cgg	tcg	cac	gcc	aac	ggg	gtg	aag	300
Arg	Ser	Arg	Leu	Ala	Leu	Ser	Arg	Arg	Ser	His	Ala	Asn	Gly	Val	Lys	
	65				70					75					80	

cca	gac	gtc	atg	cac	cac	atc	tcc	acg	ccg	ctc	gtc	tcc	aag	gca	ctg	348
Pro	Asp	Val	Met	His	His	Ile	Ser	Thr	Pro	Leu	Val	Ser	Lys	Ala	Leu	
				85					90					95		

agt	aac	cgt	ggg	cag	cac	agc	atc	tcg	tat	aca	ctg	tcc	cgg	agc	cac	396
Ser	Asn	Arg	Gly	Gln	His	Ser	Ile	Ser	Tyr	Thr	Leu	Ser	Arg	Ser	His	
			100					105					110			

tcg	gtc	ata	gtg	gag	tat	aca	cat	gat	agc	gac	aca	gac	atg	ttc	cag	444
Ser	Val	Ile	Val	Glu	Tyr	Thr	His	Asp	Ser	Asp	Thr	Asp	Met	Phe	Gln	
		115					120					125				

att	ggc	cgc	tcc	aca	gag	aac	atg	att	gac	ttc	gtg	gta	aca	gac	acg	492
Ile	Gly	Arg	Ser	Thr	Glu	Asn	Met	Ile	Asp	Phe	Val	Val	Thr	Asp	Thr	
	130					135					140					

tcc	cct	gga	gga	ggg	gct	gcc	gag	ggc	cct	tct	gcc	cag	agc	acc	atc	540
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----



Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Glu	Gly	Pro	Ser	Ala	Gln	Ser	Thr	Ile	
145						150				155					160	
tcc	cgc	tat	gcc	tgc	cgc	atc	ctc	tgt	gac	cgc	cgg	cca	ccc	tat	act	588
Ser	Arg	Tyr	Ala	Cys	Arg	Ile	Leu	Cys	Asp	Arg	Arg	Pro	Pro	Tyr	Thr	
				165					170					175		
gcc	cgc	atc	tat	gcc	gct	ggc	ttc	gac	gcc	tct	agc	aac	atc	ttc	ctt	636
Ala	Arg	Ile	Tyr	Ala	Ala	Gly	Phe	Asp	Ala	Ser	Ser	Asn	Ile	Phe	Leu	
				180				185					190			
gga	gag	cga	gcg	gcc	aaa	tgg	cgg	acc	cca	gat	ggc	ctg	atg	gat	gga	684
Gly	Glu	Arg	Ala	Ala	Lys	Trp	Arg	Thr	Pro	Asp	Gly	Leu	Met	Asp	Gly	
				195			200					205				
ctg	acc	acc	aat	gga	gtc	ctg	gtg	atg	cac	ccg	gca	ggc	ggc	ttc	tcc	732
Leu	Thr	Thr	Asn	Gly	Val	Leu	Val	Met	His	Pro	Ala	Gly	Gly	Phe	Ser	
				210			215				220					
gag	gac	tca	gcc	ccg	ggt	gtc	tgg	cgg	gag	atc	tcg	gtc	tgt	ggg	aat	780
Glu	Asp	Ser	Ala	Pro	Gly	Val	Trp	Arg	Glu	Ile	Ser	Val	Cys	Gly	Asn	
225					230					235					240	
gtg	tac	aca	ttg	cgg	gac	agc	cgc	tca	gcc	cag	cag	cgg	ggc	aag	ctg	828
Val	Tyr	Thr	Leu	Arg	Asp	Ser	Arg	Ser	Ala	Gln	Gln	Arg	Gly	Lys	Leu	
				245					250					255		
gtg	gaa	aac	gag	tcc	aac	gtg	ctg	cag	gac	ggc	tct	ctc	atc	gac	ctg	876
Val	Glu	Asn	Glu	Ser	Asn	Val	Leu	Gln	Asp	Gly	Ser	Leu	Ile	Asp	Leu	
				260				265					270			
tgt	ggg	gcc	aca	ctg	ctg	tgg	cgc	aca	ccg	gcg	ggg	ctg	ctg	cgg	gct	924
Cys	Gly	Ala	Thr	Leu	Leu	Trp	Arg	Thr	Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Arg	Ala	
				275			280					285				
ccc	aca	ctg	aag	cat	ctg	gag	gcc	cag	cgg	cag	gag	gca	aat	gca	gcg	972
Pro	Thr	Leu	Lys	His	Leu	Glu	Ala	Gln	Arg	Gln	Glu	Ala	Asn	Ala	Ala	
				290			295				300					
cgg	ccc	cag	tgc	ccc	gtg	ggc	ctc	agc	act	ctg	gcc	ttc	ccc	agc	cca	1020
Arg	Pro	Gln	Cys	Pro	Val	Gly	Leu	Ser	Thr	Leu	Ala	Phe	Pro	Ser	Pro	
305					310					315					320	
gcc	cgt	ggc	cgc	aca	gcg	ccc	gac	aaa	cag	cag	ccc	tgg	gtc	tac	gtc	1068
Ala	Arg	Gly	Arg	Thr	Ala	Pro	Asp	Lys	Gln	Gln	Pro	Trp	Val	Tyr	Val	
				325				330						335		
cgc	tgc	ggg	cac	gtc	cat	ggc	tac	cac	ggc	tgg	ggc	tgc	cgg	cgg	gag	1116

Arg Cys Gly His Val His Gly Tyr His Gly Trp Gly Cys Arg Arg Glu  
 340 345 350  
 cgg ggc ccc cag gag cgc gaa tgt cct ctc tgc cgc ctt gtg ggg cct 1164  
 Arg Gly Pro Gln Glu Arg Glu Cys Pro Leu Cys Arg Leu Val Gly Pro  
 355 360 365  
 tat gtg cct ata tgg ctt ggc cag gag gcc ggc ctc tgc ctg gac cct 1212  
 Tyr Val Pro Ile Trp Leu Gly Gln Glu Ala Gly Leu Cys Leu Asp Pro  
 370 375 380  
 ggg ccg act agc cat gcc ttt gca cct tgc ggc cac gtc tgc tct gag 1260  
 Gly Pro Thr Ser His Ala Phe Ala Pro Cys Gly His Val Cys Ser Glu  
 385 390 395 400  
 aag act gcc cgc tac tgg gcc cag aca cca ctg ccc cac ggc acc cat 1308  
 Lys Thr Ala Arg Tyr Trp Ala Gln Thr Pro Leu Pro His Gly Thr His  
 405 410 415  
 gct ttc cat gcc gcc tgc ccc ttt tgc ggg gcc tgg ctt acc ggc gag 1356  
 Ala Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Gly Ala Trp Leu Thr Gly Glu  
 420 425 430  
 cat ggc tgc gtc cgc ctc att ttc cag ggc ccg ctg gat taggctccct 1405  
 His Gly Cys Val Arg Leu Ile Phe Gln Gly Pro Leu Asp  
 435 440 445  
 ggggccccct gctgctgtgc ccacctgcc acccaggtcc ccacctctg cagcccagag 1465  
 ggagctctgc atgtgggaca ctccctgctg gcacagccac accagatgga catgttgat 1525  
 gggctgtgcc cttccccca actgtggccc cccaaggagg tccccaatg ctccaccca 1585  
 gtcattgtga tggggccttc agcaccagct ctgtcctggg tcgatggagg aaagcccagc 1645  
 cccatggcct tgccttctc ggggcatccc acatcgtgcc gccgacactg tgtgcccctg 1705  
 ggggagtga ggggccaggg gcctttgacc ccagcttag gctggctatg ccctgagcct 1765  
 gccaacccag ttccagacac tcattcttca tcttctctgc tgcgcccctg ggttctctta 1825  
 taaacctgc tgctcagctg cccccacaag tcccatatgc ccgcatgcg tgcaatgcct 1885  
 ccagcccca agtgagtggg ggggtgggtgg caggctgggc ctagcacttg ctgatagcca 1945  
 ctatgggctc gactctgtgc taagtggat ctggggacac agaggcaatc agacctggtt 2005  
 cccccctgg tggagttcac agtctagtgg aggacagact gttaacaaat ggcaacacgg 2065

cttcatgcgt gccaggatca gagtacaaat caggctgtgg caggcctcac tggtaatgga 2125  
 aaagtgaggg aggcttcacg gaggaggtgt cataggagct cagcctcaac ggctgctcgg 2185  
 aaccctccga gtccacaaga tgggaagcaa gtccacaaga tgggaagcgt gctctataca 2245  
 gaagggaggg cctgtgcaca ggctcaggtg tcagtaagcc agaaatccag ggacagagtc 2305  
 aggatggctg gagcatggac tgcgggggga acagagaagg gggaggagca aaaggttggg 2365  
 accatgtgac caggggaagat gctggatgga ggattctgaa cctcatttgt ggacggtcag 2425  
 gagtcaacaa agggaggaga gaggactcac tggtaagag tgcgggctgt gacacaaggg 2485  
 ccatcatccc tgaatgccca ccatgtgccc cgcactgtgc tgatgatgat aataataact 2545  
 acgtccattg agcactctcc agaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2589

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 445

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

Met Val Leu Glu Gly Asn Pro Glu Val Gly Ser Pro Arg Thr Ser Asp  
 1 5 10 15

Leu Gln His Arg Gly Asn Lys Gly Ser Cys Val Leu Ser Ser Pro Gly  
 20 25 30

Glu Asp Ala Gln Pro Gly Glu Glu Pro Ile Lys Tyr Gly Glu Leu Ile  
 35 40 45

Val Leu Gly Tyr Asn Gly Cys Leu Ala Ser Gly Asp Lys Gly Arg Arg  
 50 55 60

Arg Ser Arg Leu Ala Leu Ser Arg Arg Ser His Ala Asn Gly Val Lys  
 65 70 75 80

Pro Asp Val Met His His Ile Ser Thr Pro Leu Val Ser Lys Ala Leu  
 85 90 95

Ser Asn Arg Gly Gln His Ser Ile Ser Tyr Thr Leu Ser Arg Ser His  
 100 105 110

Ser Val Ile Val Glu Tyr Thr His Asp Ser Asp Thr Asp Met Phe Gln

115	120	125
Ile Gly Arg Ser Thr Glu Asn Met Ile Asp Phe Val Val Thr Asp Thr		
130	135	140
Ser Pro Gly Gly Gly Ala Ala Glu Gly Pro Ser Ala Gln Ser Thr Ile		
145	150	155
Ser Arg Tyr Ala Cys Arg Ile Leu Cys Asp Arg Arg Pro Pro Tyr Thr		
	165	170
		175
Ala Arg Ile Tyr Ala Ala Gly Phe Asp Ala Ser Ser Asn Ile Phe Leu		
	180	185
		190
Gly Glu Arg Ala Ala Lys Trp Arg Thr Pro Asp Gly Leu Met Asp Gly		
	195	200
		205
Leu Thr Thr Asn Gly Val Leu Val Met His Pro Ala Gly Gly Phe Ser		
	210	215
		220
Glu Asp Ser Ala Pro Gly Val Trp Arg Glu Ile Ser Val Cys Gly Asn		
225	230	235
		240
Val Tyr Thr Leu Arg Asp Ser Arg Ser Ala Gln Gln Arg Gly Lys Leu		
	245	250
		255
Val Glu Asn Glu Ser Asn Val Leu Gln Asp Gly Ser Leu Ile Asp Leu		
	260	265
		270
Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp Arg Thr Pro Ala Gly Leu Leu Arg Ala		
	275	280
		285
Pro Thr Leu Lys His Leu Glu Ala Gln Arg Gln Glu Ala Asn Ala Ala		
	290	295
		300
Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Leu Ser Thr Leu Ala Phe Pro Ser Pro		
305	310	315
		320
Ala Arg Gly Arg Thr Ala Pro Asp Lys Gln Gln Pro Trp Val Tyr Val		
	325	330
		335
Arg Cys Gly His Val His Gly Tyr His Gly Trp Gly Cys Arg Arg Glu		
	340	345
		350
Arg Gly Pro Gln Glu Arg Glu Cys Pro Leu Cys Arg Leu Val Gly Pro		
	355	360
		365
Tyr Val Pro Ile Trp Leu Gly Gln Glu Ala Gly Leu Cys Leu Asp Pro		

370

375

380

Gly Pro Thr Ser His Ala Phe Ala Pro Cys Gly His Val Cys Ser Glu  
 385 390 395 400

Lys Thr Ala Arg Tyr Trp Ala Gln Thr Pro Leu Pro His Gly Thr His  
 405 410 415

Ala Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Gly Ala Trp Leu Thr Gly Glu  
 420 425 430

His Gly Cys Val Arg Leu Ile Phe Gln Gly Pro Leu Asp  
 435 440 445

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 1565

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (51)..(1310)

&lt;223&gt; codierender Bereich der M33 cDNA des Menschen

&lt;400&gt; 15

cggcggaggc ggcggcgctcg gcggcggcgt cggcggccga gcggggctcc atg ttt 56  
 Met Phe  
 1

tcc cct ggc cag gag gaa cac tgc gcc ccc aat aag gag cca gtg aaa 104  
 Ser Pro Gly Gln Glu Glu His Cys Ala Pro Asn Lys Glu Pro Val Lys  
 5 10 15

tac ggg gag ctg gtg gtg ctc ggg tac aat ggt gct tta ccc aat gga 152  
 Tyr Gly Glu Leu Val Val Leu Gly Tyr Asn Gly Ala Leu Pro Asn Gly  
 20 25 30

gat aga gga cgg agg aaa agt aga ttt gcc ctc tac aag cgg ccc aag 200  
 Asp Arg Gly Arg Arg Lys Ser Arg Phe Ala Leu Tyr Lys Arg Pro Lys  
 35 40 45 50

gca aat ggt gtc aaa ccc agc acc gtc cat gtg ata tcc acg ccc cag 248  
 Ala Asn Gly Val Lys Pro Ser Thr Val His Val Ile Ser Thr Pro Gln  
 55 60 65

gca tcc aag gct atc agc tgc aaa ggt caa cac agt ata tcc tac act 296

Ala	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Gln	His	Ser	Ile	Ser	Tyr	Thr	
			70					75					80			
ttg	tca	agg	aat	cag	act	gtg	gtg	gtg	gag	tac	aca	cat	gat	aag	gat	344
Leu	Ser	Arg	Asn	Gln	Thr	Val	Val	Val	Glu	Tyr	Thr	His	Asp	Lys	Asp	
			85					90					95			
acg	gat	atg	ttt	cag	gtg	ggc	aga	tca	aca	gaa	agc	cct	atc	gac	ttc	392
Thr	Asp	Met	Phe	Gln	Val	Gly	Arg	Ser	Thr	Glu	Ser	Pro	Ile	Asp	Phe	
			100				105					110				
gtt	gtc	aca	gac	acg	att	tct	ggc	agc	cag	aac	acg	gac	gaa	gcc	cag	440
Val	Val	Thr	Asp	Thr	Ile	Ser	Gly	Ser	Gln	Asn	Thr	Asp	Glu	Ala	Gln	
						115				120			125		130	
atc	aca	cag	agc	acc	ata	tcc	agg	ttc	gcc	tgc	agg	atc	gtg	tgc	gac	488
Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Ile	Ser	Arg	Phe	Ala	Cys	Arg	Ile	Val	Cys	Asp	
				135					140					145		
agg	aat	gaa	cct	tac	aca	gca	cgg	ata	ttc	gcc	gcc	gga	ttt	gac	tct	536
Arg	Asn	Glu	Pro	Tyr	Thr	Ala	Arg	Ile	Phe	Ala	Ala	Gly	Phe	Asp	Ser	
			150					155					160			
tcc	aaa	aac	ata	ttt	ctt	gga	gaa	aag	gca	gca	aag	tgg	aaa	aac	ccc	584
Ser	Lys	Asn	Ile	Phe	Leu	Gly	Glu	Lys	Ala	Ala	Lys	Trp	Lys	Asn	Pro	
			165				170					175				
gac	ggc	cac	atg	gat	ggg	ctc	act	act	aat	ggc	gtc	ctg	gtg	atg	cat	632
Asp	Gly	His	Met	Asp	Gly	Leu	Thr	Thr	Asn	Gly	Val	Leu	Val	Met	His	
			180				185				190					
cca	cga	ggg	ggc	ttc	acc	gag	gag	tcc	cag	ccc	ggg	gtc	tgg	cgc	gag	680
Pro	Arg	Gly	Gly	Phe	Thr	Glu	Glu	Ser	Gln	Pro	Gly	Val	Trp	Arg	Glu	
			195			200			205				210			
atc	tct	gtc	tgt	gga	gat	gtg	tac	acc	ttg	cga	gaa	acc	agg	tcg	gcc	728
Ile	Ser	Val	Cys	Gly	Asp	Val	Tyr	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Arg	Ser	Ala	
				215				220					225			
cag	caa	cga	gga	aag	ctg	gtg	gaa	agt	gag	acc	aac	gtc	ctg	cag	gac	776
Gln	Gln	Arg	Gly	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Glu	Thr	Asn	Val	Leu	Gln	Asp	
			230					235					240			
ggc	tcc	ctc	att	gac	ctg	tgt	ggg	gcc	act	ctc	ctc	tgg	aga	aca	gca	824
Gly	Ser	Leu	Ile	Asp	Leu	Cys	Gly	Ala	Thr	Leu	Leu	Trp	Arg	Thr	Ala	
			245				250					255				
gat	ggg	ctt	ttt	cat	act	cca	act	cag	aag	cac	ata	gaa	gcc	ctc	cgg	872

Asp Gly Leu Phe His Thr Pro Thr Gln Lys His Ile Glu Ala Leu Arg  
 260 265 270

cag gag att aac gcc gcc cgg cct cag tgt cct gtg ggg ctc aac acc 920  
 Gln Glu Ile Asn Ala Ala Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Leu Asn Thr  
 275 280 285 290

ctg gcc ttc ccc agc atc aac agg aaa gag gtg gtg gag gag aag cag 968  
 Leu Ala Phe Pro Ser Ile Asn Arg Lys Glu Val Val Glu Glu Lys Gln  
 295 300 305

ccc tgg gca tat ctc agt tgt ggc cac gtg cac ggg tac cac aac tgg 1016  
 Pro Trp Ala Tyr Leu Ser Cys Gly His Val His Gly Tyr His Asn Trp  
 310 315 320

ggc cat cgg agt gac acg gag gcc aac gag agg gag tgt ccc atg tgc 1064  
 Gly His Arg Ser Asp Thr Glu Ala Asn Glu Arg Glu Cys Pro Met Cys  
 325 330 335

agg act gtg ggc ccc tat gtg cct ctc tgg ctt ggc tgt gag gca gga 1112  
 Arg Thr Val Gly Pro Tyr Val Pro Leu Trp Leu Gly Cys Glu Ala Gly  
 340 345 350

ttt tat gta gac gca gga ccg cca act cat gct ttc act ccc tgt gga 1160  
 Phe Tyr Val Asp Ala Gly Pro Pro Thr His Ala Phe Thr Pro Cys Gly  
 355 360 365 370

cac gtg tgc tcg gag aag tct gca aaa tac tgg tct cag atc ccg ttg 1208  
 His Val Cys Ser Glu Lys Ser Ala Lys Tyr Trp Ser Gln Ile Pro Leu  
 375 380 385

cct cat gga act cat gca ttt cac gct gct tgc cct ttc tgt gct aca 1256  
 Pro His Gly Thr His Ala Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Ala Thr  
 390 395 400

cag ctg gtt ggg gag caa aac tgc atc aaa tta att ttc caa ggt cca 1304  
 Gln Leu Val Gly Glu Gln Asn Cys Ile Lys Leu Ile Phe Gln Gly Pro  
 405 410 415

att gac tgacgccctt gacagccatc tacgacttta ttaacagggtt actgtgaaga 1360  
 Ile Asp  
 420

ttttgccact aactctagat tttacctttt tgtaatgctg tttatcagag gaggggtgaca 1420

ggggctggaa ataaagagag gggacatggt gatgaaacat ggcaggagtg taacagatac 1480

cagtgggtgtg ttgcatgctc aaaacagcag cgtcgtcatt gaagtctgct tgattaaacc 1540

ataatatctt tgtaataatt ggatt

1565

<210> 16

<211> 420

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Phe Ser Pro Gly Gln Glu Glu His Cys Ala Pro Asn Lys Glu Pro  
1 5 10 15

Val Lys Tyr Gly Glu Leu Val Val Leu Gly Tyr Asn Gly Ala Leu Pro  
20 25 30

Asn Gly Asp Arg Gly Arg Arg Lys Ser Arg Phe Ala Leu Tyr Lys Arg  
35 40 45

Pro Lys Ala Asn Gly Val Lys Pro Ser Thr Val His Val Ile Ser Thr  
50 55 60

Pro Gln Ala Ser Lys Ala Ile Ser Cys Lys Gly Gln His Ser Ile Ser  
65 70 75 80

Tyr Thr Leu Ser Arg Asn Gln Thr Val Val Val Glu Tyr Thr His Asp  
85 90 95

Lys Asp Thr Asp Met Phe Gln Val Gly Arg Ser Thr Glu Ser Pro Ile  
100 105 110

Asp Phe Val Val Thr Asp Thr Ile Ser Gly Ser Gln Asn Thr Asp Glu  
115 120 125

Ala Gln Ile Thr Gln Ser Thr Ile Ser Arg Phe Ala Cys Arg Ile Val  
130 135 140

Cys Asp Arg Asn Glu Pro Tyr Thr Ala Arg Ile Phe Ala Ala Gly Phe  
145 150 155 160

Asp Ser Ser Lys Asn Ile Phe Leu Gly Glu Lys Ala Ala Lys Trp Lys  
165 170 175

Asn Pro Asp Gly His Met Asp Gly Leu Thr Thr Asn Gly Val Leu Val  
180 185 190

Met His Pro Arg Gly Gly Phe Thr Glu Glu Ser Gln Pro Gly Val Trp  
195 200 205



Arg Glu Ile Ser Val Cys Gly Asp Val Tyr Thr Leu Arg Glu Thr Arg  
 210 215 220

Ser Ala Gln Gln Arg Gly Lys Leu Val Glu Ser Glu Thr Asn Val Leu  
 225 230 235 240

Gln Asp Gly Ser Leu Ile Asp Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp Arg  
 245 250 255

Thr Ala Asp Gly Leu Phe His Thr Pro Thr Gln Lys His Ile Glu Ala  
 260 265 270

Leu Arg Gln Glu Ile Asn Ala Ala Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Leu  
 275 280 285

Asn Thr Leu Ala Phe Pro Ser Ile Asn Arg Lys Glu Val Val Glu Glu  
 290 295 300

Lys Gln Pro Trp Ala Tyr Leu Ser Cys Gly His Val His Gly Tyr His  
 305 310 315 320

Asn Trp Gly His Arg Ser Asp Thr Glu Ala Asn Glu Arg Glu Cys Pro  
 325 330 335

Met Cys Arg Thr Val Gly Pro Tyr Val Pro Leu Trp Leu Gly Cys Glu  
 340 345 350

Ala Gly Phe Tyr Val Asp Ala Gly Pro Pro Thr His Ala Phe Thr Pro  
 355 360 365

Cys Gly His Val Cys Ser Glu Lys Ser Ala Lys Tyr Trp Ser Gln Ile  
 370 375 380

Pro Leu Pro His Gly Thr His Ala Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys  
 385 390 395 400

Ala Thr Gln Leu Val Gly Glu Gln Asn Cys Ile Lys Leu Ile Phe Gln  
 405 410 415

Gly Pro Ile Asp  
 420

<210> 17  
 <211> 570  
 <212> DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; gene

&lt;222&gt; (1)..(570)

<223> Fragment der M32 cDNA des Menschen aus dem  
C-terminalen codierenden Bereich

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(567)

&lt;223&gt; Fragment

&lt;400&gt; 17

ctg	gtg	gaa	agc	gag	acc	aat	gtc	ctg	caa	gat	ggc	tcc	ctc	att	gac	48
Leu	Val	Glu	Ser	Glu	Thr	Asn	Val	Leu	Gln	Asp	Gly	Ser	Leu	Ile	Asp	
1				5				10					15			

ctg	tgc	ggg	gcc	acg	ctc	ctc	tgg	aga	acc	gcc	gac	ggc	ctc	ttc	cac	96
Leu	Cys	Gly	Ala	Thr	Leu	Leu	Trp	Arg	Thr	Ala	Asp	Gly	Leu	Phe	His	
			20					25					30			

gca	ccg	act	cag	aag	cac	att	gaa	gcc	ctc	cgg	cag	gag	atc	aat	gca	144
Ala	Pro	Thr	Gln	Lys	His	Ile	Glu	Ala	Leu	Arg	Gln	Glu	Ile	Asn	Ala	
			35					40					45			

gcc	cga	ccc	cag	tgt	ccc	gtg	ggc	ctc	aac	acc	ctg	gcc	ttc	ccc	agc	192
Ala	Arg	Pro	Gln	Cys	Pro	Val	Gly	Leu	Asn	Thr	Leu	Ala	Phe	Pro	Ser	
		50				55					60					

atc	aac	cgg	aag	gaa	gtg	gta	gaa	gag	aag	cag	ccc	tgg	gcg	tac	ctg	240
Ile	Asn	Arg	Lys	Glu	Val	Val	Glu	Glu	Lys	Gln	Pro	Trp	Ala	Tyr	Leu	
65					70					75					80	

agc	tgc	ggt	cac	gtg	cac	ggc	tac	cac	agc	tgg	ggc	cat	cgg	agc	gac	288
Ser	Cys	Gly	His	Val	His	Gly	Tyr	His	Ser	Trp	Gly	His	Arg	Ser	Asp	
				85					90					95		

ggc	gaa	gcc	aac	gag	cgg	gag	tgt	ccc	atg	tgc	agg	act	gtg	ggc	ccc	336
Gly	Glu	Ala	Asn	Glu	Arg	Glu	Cys	Pro	Met	Cys	Arg	Thr	Val	Gly	Pro	
			100					105					110			

tat	gtc	ccc	ctc	tgg	ctg	ggc	tgt	gag	gca	ggg	ttt	tat	gtc	gat	gca	384
Tyr	Val	Pro	Leu	Trp	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala	Gly	Phe	Tyr	Val	Asp	Ala	
			115					120					125			

gga	cct	cca	act	cac	gct	ttc	acc	ccc	tgt	ggg	cac	gtc	tgt	tcg	gag	432
Gly	Pro	Pro	Thr	His	Ala	Phe	Thr	Pro	Cys	Gly	His	Val	Cys	Ser	Glu	

130	135	140	
aag tcc gca aag tac tgg tcc cag att cca ctg ccc cac gga acc cac	480		
Lys Ser Ala Lys Tyr Trp Ser Gln Ile Pro Leu Pro His Gly Thr His			
145	150	155	160
gca ttt cac gcc gcc tgt ccg ttc tgt gcc acg cag ctg gtt ggt gaa	528		
Ala Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Ala Thr Gln Leu Val Gly Glu			
165	170	175	
caa aac tgc atc aaa ttg att ttc caa ggt cca gtg gac tga	570		
Gln Asn Cys Ile Lys Leu Ile Phe Gln Gly Pro Val Asp			
180	185		

<210> 18  
 <211> 189  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 18  
 Leu Val Glu Ser Glu Thr Asn Val Leu Gln Asp Gly Ser Leu Ile Asp  
 1 5 10 15  
 Leu Cys Gly Ala Thr Leu Leu Trp Arg Thr Ala Asp Gly Leu Phe His  
 20 25 30  
 Ala Pro Thr Gln Lys His Ile Glu Ala Leu Arg Gln Glu Ile Asn Ala  
 35 40 45  
 Ala Arg Pro Gln Cys Pro Val Gly Leu Asn Thr Leu Ala Phe Pro Ser  
 50 55 60  
 Ile Asn Arg Lys Glu Val Val Glu Glu Lys Gln Pro Trp Ala Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Ser Cys Gly His Val His Gly Tyr His Ser Trp Gly His Arg Ser Asp  
 85 90 95  
 Gly Glu Ala Asn Glu Arg Glu Cys Pro Met Cys Arg Thr Val Gly Pro  
 100 105 110  
 Tyr Val Pro Leu Trp Leu Gly Cys Glu Ala Gly Phe Tyr Val Asp Ala  
 115 120 125  
 Gly Pro Pro Thr His Ala Phe Thr Pro Cys Gly His Val Cys Ser Glu  
 130 135 140

Lys Ser Ala Lys Tyr Trp Ser Gln Ile Pro Leu Pro His Gly Thr His  
145 150 155 160

Ala Phe His Ala Ala Cys Pro Phe Cys Ala Thr Gln Leu Val Gly Glu  
165 170 175

Gln Asn Cys Ile Lys Leu Ile Phe Gln Gly Pro Val Asp  
180 185

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
für PCR-Reaktionen zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

<400> 19

gatcgaattc ttttctcctg atcaagaa

28

<210> 20

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

<400> 20

gatcgtcgac ggacgtcttc catttggc

28

<210> 21

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

&lt;400&gt; 21

gatcgaattc gccaaatgga agacgtcc

28

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

&lt;400&gt; 22

gatcgtcgac cctcttcatg ctggggaa

28

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

&lt;400&gt; 23

gatcgaattc ttccccagca tgaagagg

28

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
PCR-Reaktion zur Amplifikation von Pelle aus  
Drosophila

&lt;400&gt; 24

gatcgtcgac gtctagaggt ccttggaa

28

&lt;210&gt; 25

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
PCR-Reaktion zur Amplifikation von Pelle aus  
Drosophila

<400> 25

gatctgccat gggatgagtg gcgtccagac cgccgaa

37

<210> 26

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

<400> 26

gatcgaaatc ctatcggtta acaaacggtt cgaa

34

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

<400> 27

aaagcaccag taaaatatgg tg

22

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für

PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

&lt;400&gt; 28

tggttgaata tactcatgac ag

22

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

&lt;400&gt; 29

aaatggcgat agaggaagga gg

22

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
für PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

&lt;400&gt; 30

tcacacactg gcacctggta tg

22

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
für PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

&lt;400&gt; 31

agcctaggca acagagcaag actc

24

<210> 32  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
für PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

<400> 32  
gaggttaggag aaccacttga acc

23

<210> 33  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Primer für PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30  
des Menschen

<400> 33  
ttaaactgaa acgaattggtt cac

23

<210> 34  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
für PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

<400> 34  
gtttgcataa tattgtgttc aag

23

<210> 35  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz



<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer für  
PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

<400> 35

gtaaaatata taatcattat tgg

23

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Primer für PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30  
des Menschen

<400> 36

tgatctcttg caagaactgc ac

22

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
für PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

<400> 37

gtacaagcaa tatgcacagt gc

22

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
für PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

<400> 38

tgatcatgagt atattcaacc ac

22

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Primer für PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30  
des Menschen

&lt;400&gt; 39

ccgtgtcagt tactacaaaa tc

22

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Primer  
für PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

&lt;400&gt; 40

agacagagtc ttgctctgtt gc

22

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Primer für PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30  
des Menschen

&lt;400&gt; 41

gaaaaaagtta atagcaaaaa ttag

24

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
für PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 des  
Menschen

<400> 42

tgatgagtca aatcctgcag c

21

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
für PCR-Reaktion zur Amplifikation von Cyclophilin

<400> 43

accccaccgt gttcttcgac

20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
für PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 der  
Maus

<400> 44

catttgccat ggacaagatg

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
für PCR-Reaktion zur Amplifikation von M30 der  
Maus

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur  
Isolierung von murinen cDNAs (mM31-5'40) in  
Beispiel 9.

&lt;400&gt; 49

gagagagaga gagagagctc gagnnnnnn

29

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur  
Isolierung von murinen cDNAs (mM31-bio25) in  
Beispiel 8

&lt;400&gt; 50

cggtcaggag gccggtctct gcctg

25

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur  
Isolierung muriner cDNAs (mM31-3'40) in Beispiel 8

&lt;400&gt; 51

ctctctgccg ccttgtggga ccctatgtgc ccctgtggct

40

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur  
Isolierung der humanen cDNAs (5'M31hum5'40) in  
Beispiel 8

&lt;400&gt; 52

gaccctgggc caccagcca cgcttttgca ccctgtggcc

40

&lt;400&gt; 45

tactcagac agcaacactg

20

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: degenerierte  
Oligonukleotidsequenz aus Beispiel 7

&lt;400&gt; 46

gttttttgat gaatcaaatc c

21

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: degenerierte  
Oligonukleotidsequenz aus Beispiel 8.

&lt;400&gt; 47

aaytgyggnc aygtncangg

20

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
random-Primer im Rahmen von Beispiel 8 verwendet

&lt;400&gt; 48

tgrtgngcgc araanggrca

20

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

<210> 53

<211> 40

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur Isolierung der humanen cDNAs (5'M31hum-bio25) in Beispiel 8

<400> 53

acctgcccac ccaggtcccc acctcctgca gccagaggg

40

<210> 54

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur Isolierung der humanen cDNAs (5'M31hum3'40) in Beispiel 8

<400> 54

agctctgcat gtgggacact ccctg

25

<210> 55

<211> 40

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur Isolierung von humanen cDNAs (5'M31hum3'40) in Beispiel 8

<400> 55

ctggcacagc acaccagatg gacatgttgg atgggctgtg

40

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
14. März 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/021138 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/68,  
C07K 14/00, 16/00, A61K 48/00, C12N 5/00, A01K  
67/027, G01N 33/574, A61P 25/28, 35/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/10366

(22) Internationales Anmeldedatum:  
7. September 2001 (07.09.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
09/657,479 7. September 2000 (07.09.2000) US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): ANARON BIOSCIENCE AG [DE/DE]; Im Neuen-  
heimer Feld 515, 69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder: und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHNEIDER, Armin  
[DE/DE]; Am Büchsenackerhang 69, 69118 Heidel-  
berg (DE). HIEMISCH, Holger [DE/DE]; Peterstaler  
Strasse 115, 69118 Heidelberg (DE). ROSSNER, Moritz  
[DE/DE]; Zähringerstrasse 41, 68723 Schwetzingen (DE).  
KLUGMANN, Matthias [DE/DE]; Mittermaierstrasse  
12, 69115 Heidelberg (DE). NAIM, Jomana [DE/DE];  
Im Buschgewann 29, 69123 Heidelberg (DE). EISEN-  
HARDT, Gisela [DE/DE]; Emmertsgrundpassage 23,  
69126 Heidelberg (DE). KUNER, Rohini [DE/DE];  
Turnerstrasse 50, 69126 Heidelberg (DE). LANAHAN,

Anthony [US/US]; 15 Dendron Court, Parkville, MD  
21234 (US). WORLEY, Paul [US/US]; 17 Blythewood  
Road, Baltimore, MD 21210 (US). SPIELVOGEL,  
Daniela [DE/DE]; Rathenaustrasse 4, 68165 Mannheim  
(DE). SCHEEK, Sigrid [DE/DE]; Jahnstrasse 36, 69221  
Dossenheim (DE).

(74) Anwalt: ISENBRUCK, Günter; Bardehle-Pagenberg-  
Dost-Altenburg-Geissler-Isenbruck, Theodor-Heuss-An-  
lage 12, 68165 Mannheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,  
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 20. März 2003

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: THE M30 GENE FAMILY AND THE UTILIZATION THEREOF

(54) Bezeichnung: DIE M30-GENFAMILIE UND IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to, among other things, a method for diagnosing neurodegenerative diseases. According to the invention, the concentration of a protein, which shares similarities with the protein Pellino, or of a mammal homologue of this protein or of a mutant of this protein, which, over a domain of 50 amino acids of the amino sequence thereof, shares a sequence identity of over 60 % with one of the sequences, is determined in a body sample. The invention also relates to the utilization of ligands, which bind to M30 and to the homologues thereof, and to the utilization of functional inhibitors for producing a medicament for treating neurodegenerative diseases. The invention additionally relates to a screening method for identifying and/or characterizing functional inhibitors and/or ligands of M30 or of a homologue of M30.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft unter anderem ein Verfahren zur Diagnose neurodegenerativer Erkrankungen, bei dem die Konzentration eines Proteins, das Ähnlichkeiten mit dem Protein Pellino besitzt, oder eines Säugetier-Homologes dieses Proteins oder eines Mutants dieses Proteins, das über einen Bereich von 50 Aminosäuren seiner Aminosäuresequenz eine Sequenzidentität mit einer der Sequenzen von über 60 % aufweist, in einer Körperprobe bestimmt wird. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Liganden, die an M30 und seine Homologen binden, sowie die Verwendung von funktionalen Inhibitoren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen. Desweiteren betrifft die Erfindung ein Screening-Verfahren zur Identifikation und/oder zur Charakterisierung von funktionalen Inhibitoren und/oder von Liganden von M30 oder einem Homologen von M30.

WO 02/021138 A3



*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.  
PCT/EP 01/10366

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/68 C07K14/00 C07K16/00 A61K48/00 C12N5/00  
A01K67/027 G01N33/574 A61P25/28 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KRAMER GERO ET AL: "Determination of apoptotic activity in the sera of patients with hormone refractory prostate cancer by a novel M30 apoptosis assay." EUROPEAN UROLOGY, vol. 39, no. Suppl. 5, March 2001 (2001-03), page 80 XP009000127 XVth Congress of the European Association of Urology; Geneva, Switzerland; April 07-10, 2001 ISSN: 0302-2838 the whole document  -/-	11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 October 2002

Date of mailing of the international search report

20/11/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno de Vega, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/10366

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LINDER S. ET AL: "The M30 antibody can be used to quantitate apoptosis in breast cancer cell extracts and culture supernatants." TUMOR BIOLOGY, vol. 21, no. Supplement 1, September 2000 (2000-09), page 30 XP001105832 28th Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine; Munich, Germany; September 08-13, 2000 ISSN: 1010-4283 the whole document	11
X	--- DATABASE SWALL 'Online! retrieved from EBI Database accession no. 077237 XP002217749	2
Y	abstract	2-9, 12, 13
X	--- DATABASE EMBL 'Online! retrieved from EBI Database accession no. AP002748 XP002217750	3
Y	abstract	2-9, 12, 13
	-----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP01/10366

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 14-17  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**See Supplement Sheet Additional matter PCT ISA/210**
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

EP01/10366

Continuation of I.2

Claims: 14 to 17

Current Claims 14 to 17 can be related to a product that is defined by the following parameters:

P1: dissociation constants on a protein

The use of these parameters has to seem in the given context like a lack of clarity as defined in PCT Article 6. It is impossible to compare the parameters chosen by the applicant with that which the prior art discloses. The lack of clarity is such that it renders a meaningful search impossible.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/10366

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/68 C07K14/00 C07K16/00 A61K48/00 C12N5/00  
 A01K67/027 G01N33/574 A61P25/28 A61P35/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EMBL

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>KRAMER GERO ET AL: "Determination of apoptotic activity in the sera of patients with hormone refractory prostate cancer by a novel M30 apoptosis assay."            EUROPEAN UROLOGY,            Bd. 39, Nr. Suppl. 5, März 2001 (2001-03),            Seite 80 XP009000127            XVIth Congress of the European Association of Urology; Geneva, Switzerland; April 07-10, 2001            ISSN: 0302-2838            das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist.

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Oktober 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

20/11/2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno de Vega, C

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	LINDER S ET AL: "The M30 antibody can be used to quantitate apoptosis in breast cancer cell extracts and culture supernatants." TUMOR BIOLOGY, Bd. 21, Nr. Supplement 1, September 2000 (2000-09), Seite 30 XP001105832 28th Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine;Munich, Germany; September 08-13, 2000 ISSN: 1010-4283 das ganze Dokument	11
X	DATABASE SWALL 'Online! retrieved from EBI Database accession no. 077237 XP002217749	2
Y	Zusammenfassung	2-9,12, 13
X	DATABASE EMBL 'Online! retrieved from EBI Database accession no. AP002748 XP002217750	3
Y	Zusammenfassung	2-9,12, 13

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 14-17  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 14-17

Die geltenden Patentansprüche 14-17 sind auf ein Produkt, das mittels folgender Parameter definiert wird, zu beziehen:

PI: Dissoziationskonstante an ein Protein

Die Verwendung dieser Parameter muss im gegebenen Zusammenhang als Mangel an Klarheit im Sinne von Art. 6 PCT erscheinen. Es ist unmöglich, die vom Anmelder gewählten Parameter mit dem zu vergleichen, was der Stand der Technik hierzu offenbart. Der Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche unmöglich macht.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.